



**Joana Sofia Ramos  
de Oliveira Pinto**

**Ação do extrato etanólico de *Sarcocornia  
perennis* em ratinhos**



**Joana Sofia Ramos  
de Oliveira Pinto**

**Ação do extrato etanólico de *Sarcocornia  
perennis* em ratinhos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Helena Silva, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro do CICECO

Apoio financeiro do CESAM

Dedico este trabalho à minha mãe, irmão e avós

## **o júri**

presidente

Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves  
Professora Associada, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

vogal

Doutora Elisabete Verde Martins Coelho  
Investigadora em Pós-Doc, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

arguente

Doutora Virgília Sofia Almeida de Azevedo e Silva  
Professora Auxiliar Convidada, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

orientadora

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira  
Professora Associada com Agregação, Departamento de Biologia,  
Universidade de Aveiro

co-orientadora

Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva  
Professora Auxiliar, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

À Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira e à Professora Doutora Helena Silva pela disponibilidade, colaboração e simpatia demonstradas ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Manuel Coimbra, Doutora Elisabete Coelho e Dr. Mickael Santos do Laboratório de Bioquímica e Química Alimentar (Departamento de Química da Universidade de Aveiro) pela disponibilidade, conselhos e preciosa ajuda prestada durante alguns dos procedimentos efetuados.

Ao Dr. Américo Freitas, Dr<sup>a</sup>. Teresa Raposo, Dr. António Ferreira Neves, Dr. Alberto Ferreira Neves, Dr. António Rodrigues e Técnica Almerinda Felizardo, do laboratório de Análises Químicas AVELAB (Aveiro), pela disponibilização de recursos e auxílio nos procedimentos técnicos, relativamente aos ensaios bioquímicos.

À Professora Doutora Etelvina Figueira pela disponibilidade e esclarecimento de algumas dúvidas.

Aos Técnicos Aldiro Pereira e Rui Marques pela ajuda fornecida em algumas técnicas.

À Catarina Oliveira, pela amizade e apoio durante todo o trabalho.

À Sónia Oliveira, Elsa Dias e Ana Gomes pela ajuda em vários procedimentos inerentes a este trabalho.

## palavras-chave

*Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*, toxicidade, proteção, actividade antioxidante, CCl<sub>4</sub>, fígado, baço, rim, testículo, epidídimo

## resumo

As plantas têm tido um crescente interesse na comunidade científica, devido aos compostos fisiologicamente ativos que as tornam potenciais agentes terapêuticos.

Numa primeira fase deste estudo, o extrato etanólico (EE) de *S. perennis* subsp. *perennis* foi submetido a uma análise de açúcares e de compostos fenólicos, procedendo-se ainda à avaliação da atividade antioxidante. O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos desse EE em ratinhos, expostos e não expostos ao CCl<sub>4</sub>. Para tal, foi realizada uma análise histopatológica do fígado, rim, baço, testículos e epidídimo e uma avaliação bioquímica da função hepática. Foram utilizados 30 ratinhos machos da estirpe ICR-CD1, divididos em 6 grupos (n=5): um grupo controlo negativo ao qual foi fornecida apenas água; um grupo (controlo positivo) em que os ratinhos foram administrados com uma injeção de 0,25 mL de CCl<sub>4</sub> em azeite, por via subcutânea, na concentração de 0,5 mL/Kg, 24 horas antes do sacrifício; dois grupos ao qual se forneceu EE liofilizado, diluído na água, nas concentrações de 0,5 mg/mL/dia e 2,0 mg/mL/dia e dois grupos fornecidos com EE liofilizado nas mesmas concentrações e ainda administrados com CCl<sub>4</sub> do mesmo modo realizado para o controlo positivo. A experiência teve uma duração de 30 dias.

Os resultados demonstraram a presença de compostos com forte atividade antioxidante (24,30±2,43 mg/g de equivalentes em ácido gálico e 12,03±2,06 mg/g de equivalentes em trolox) no EE. O extrato demonstrou alguns efeitos protetores em animais submetidos ao CCl<sub>4</sub>, diminuindo o número de lesões histológicas no fígado e baço e o peso dos rins. Estes efeitos poderão estar relacionados com a capacidade antioxidante dos compostos presentes. Entretanto, o EE *per se* provocou alterações histológicas, principalmente ao nível do sistema reprodutor masculino, sugerindo que o extrato poderá conter uma fração com efeito tóxico. Pela análise dos valores da AST e ALT, não foi possível avaliar o possível efeito protetor do EE, dada a variabilidade dos valores encontrados. Observaram-se valores extremamente baixos para estas enzimas em ratinhos expostos ao CCl<sub>4</sub>, principalmente no grupo controlo positivo, o que contraria as informações da literatura que relatam o aumento dos seus níveis quando os hepatócitos são danificados. Estes resultados poderão indicar que a severidade dos danos causados nos tecidos afeta a atividade destas enzimas.

Conclui-se que o EE possui efeitos protetores contra os efeitos tóxicos induzidos pelo CCl<sub>4</sub>, principalmente no fígado e baço. Já o EE *per se*, demonstra potenciais efeitos tóxicos principalmente ao nível do sistema reprodutor.

Futuros trabalhos são necessários para melhor compreender os efeitos observados do EE de *S. perennis* subsp. *perennis*.

## keywords

*Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*, toxicity, protection, antioxidant activity, CCl<sub>4</sub>, liver, spleen, kidney, testis, epididymis

## abstract

Plants have been a growing interest in the scientific community due to their physiologically active compounds, making them potential therapeutic agents. In the first phase of this study, the ethanolic extract (EE) of *S. perennis* subsp. *perennis* was analyzed for sugars and phenolic compounds, as well as antioxidant activity. The main aim of this work was to evaluate the effects of the EE in mice exposed and non exposed to CCl<sub>4</sub>. A histopathological analysis of liver, kidney, spleen, testis and epididymis and a biochemical evaluation of liver function was performed. Thirty male mice of ICR-CD1 strain were divided into 6 groups (n = 5): a negative control group which was given only tap water, a positive control group in which mice were administered with an injection of 0.25 mL of CCl<sub>4</sub> in olive oil, subcutaneously, at 0.5 mL/kg, 24 hours before sacrifice; two groups were provided with lyophilized EE, diluted in water, at the concentrations of 0.5 mg /mL/ day and 2.0 mg / mL / day and two groups were provided with lyophilized EE at the same concentrations and administered with CCl<sub>4</sub> in the same way that was done for the positive control. The experiment lasted 30 days.

Some compounds with strong antioxidant activity ( $24.30 \pm 2.43$  mg/g of gallic acid equivalents and  $12.03 \pm 2.06$  mg /g of trolox equivalents) were found in EE. The extract evidenced protective effects on mice exposed to CCl<sub>4</sub>, decreasing the amount of lesions in the liver and spleen and reducing the weight of the kidneys. These effects may be related to the ability of antioxidant compounds. However, the EE *per se* caused histological changes, especially in the reproductive system, suggesting that the extract may contain a toxic fraction. It was not possible to evaluate the possible protective effects of EE, due to the variability of AST and ALT values. Low values for these enzymes in mice exposed to CCl<sub>4</sub>, were found, especially in the positive control group, which contradicts the information reported in the literature, where an increase in their levels appears when hepatocytes are damaged. These results may indicate that the severity of tissue damage affected the activity of these enzymes.

It is concluded that the EE has protective effects against CCl<sub>4</sub>, mainly in the liver and spleen. The EE *per se*, demonstrates potential toxic effects mainly at the reproductive system.

Future studies are needed to better understand the observed effects of EE of *S.perennis* subsp. *perennis*.

# Índice

I. Introdução .....	13
I.1. Fitoterapia .....	13
I.2. Propriedades químicas e efeitos terapêuticos das plantas medicinais .....	14
I.3. Propriedades antioxidantes das plantas medicinais .....	15
I.4. Compostos fenólicos .....	16
I.5. <i>Sarcocornia perennis</i> subsp. <i>perennis</i> .....	17
I.6. Tetracloroeto de carbono .....	19
I.7. Órgãos em estudo .....	19
I.7.1. Fígado .....	20
I.7.1.1 Parâmetros bioquímicos para análise de hepatotoxicidade .....	20
I.7.1.2 Extratos de plantas com atividade hepatoprotetora .....	21
I.7.2. Rins .....	21
I.7.4. Baço .....	22
I.7.5. Testículo e epidídimo .....	23
I.8. Enquadramento do trabalho e objetivos .....	24
II - Material e Métodos.....	25
II.1. Colheita e análise de compostos em <i>Sarcocornia perennis</i> subsp. <i>perennis</i> .....	25
II.2. Extração em etanol .....	25
II.3. Análise de açúcares neutros.....	26
II.3.1. Hidrólise .....	26
II.3.2. Redução e acetilação.....	26
II.3.3. Análise por GC-FID.....	27
II.4. Análise de ácidos urónicos .....	27
II.5. Determinação de compostos fenólicos (equivalentes em ácido gálico) .....	28
II.6. Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS.....	29
II.7. Avaliação dos efeitos do extrato etanólico de <i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i> em ratinhos .....	29
II.7.1. Administração do extrato aos animais.....	30
II.7.2. Avaliação da função hepática.....	31
II.7.3. Técnicas Histológicas.....	31



II.7.4. Análise semi-quantitativa das alterações histológicas.....	31
II.8. Análise Estatística.....	32
III- Resultados e Discussão .....	33
III.1. Análise de compostos e atividade antioxidante .....	33
III.2. Comportamento dos animais ao longo da experiência .....	35
III.3. Peso corporal e rácios dos pesos dos órgãos.....	35
III.4. Análise macroscópica dos órgãos .....	36
III.5. Análise histológica do fígado.....	37
III.6. Análise histológica do rim .....	42
III.7. Análise histológica do baço .....	46
III.8. Análise histológica do testículo .....	50
III.9. Análise histológica do epidídimo .....	54
III.10. Avaliação da função hepática.....	57
IV. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	60
V. Referências Bibliográficas .....	62
ANEXO 1 .....	71

## Índice de figuras

Figura 1: *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* (Sapal de Verdemilho da ria de Aveiro) 17

Figura 2: Fígado de ratinhos do grupo 1 (controlo negativo), HE. A - Veia central (VC) e veia porta (VP), 100x. B - Cordões de hepatócitos e veia central (VC), 400x, C - Veia porta (VC) e ductos biliares (\*), 400x. .... 37

Figura 3: Fígado de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia), HE. A – grupo 3: congestão da veia porta (+) e inflamação (seta preta) do epitélio do ducto biliar (\*), 400x. B – grupo 4: congestão de veia hepática (+), 100x. C – grupo 3: necrose zonal de hepatócitos (+) e infiltrado inflamatório (seta preta), 400x. D – grupo 4: necrose de hepatócitos em redor da veia porta (VP), 400x. E (grupo 3) e F (grupo 4): parênquima hepático normal, 400x. .... 38

Figura 4: Fígado de ratinhos do grupo 2 (controlo positivo), HE. A – Necrose centrolobular e hemorragias, 40x. B – Necrose centrolobular (+), Veia central (VC), 400x. C – Veia porta (VP) congestionada, hemorragias e esteatose (→), 400x. D – Esteatose (→), 400x. .... 39

Figura 5: Fígado de ratinhos dos grupos pré-tratados com EE (grupo 5: 0,5 mg/mL/dia e grupo 6: 2,0 mg/mL/dia) e CCl<sub>4</sub>, na dose de 0,5ml/Kg, 24 horas antes do sacrifício, HE. A (grupo 5) e B (grupo 6): necrose centrolobular e células em tumefação hidrópica a circundá-la, 40x. C (grupo 5) e D (grupo 6): necrose centrolobular (+) e células em tumefação hidrópica (⇒), 400x. E (grupo 5) e F (grupo 6): parênquima hepático, entre áreas de necrose, com especto normal, 400x. .... 40

Figura 6: Rim de ratinho do grupo 1 (controlo negativo), HE. A -Túbulos renais (T) e glomérulo renal (G) na zona cortical, 400x. B – Túbulos renais na zona medular (T), 400x. .... 42

Figura 7: Rim de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia), HE, 400x. A – grupo 3: parênquima normal, glomérulo (G). B – grupo 4: glomérulo (G) ligeiramente aumentado e com leve infiltrado inflamatório. C (grupo 3): infiltrado inflamatório e hemorragia (setas); D (grupo 4): infiltrado inflamatório (seta). .... 43

Figura 8: Rim de ratinho do grupo 2 (controlo positivo), HE. A – Glomérulo (G) atrofiado e aumento do espaço de Bowman, infiltrado inflamatório (seta preta), 400x. B – Necrose

dos túbulos (T), 400x. C – Dilatação dos túbulos renais (T), 400x. D – massa hialina no interior do túbulo renal (seta a negro), 1000x. .... 44

Figura 9: Rim de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia) e CCl<sub>4</sub>, na dose de 0,5ml/Kg, 24 horas antes do sacrifício, HE, 400x. A – grupo 3: glomérulo (G) aumentado e desorganizado, infiltrado inflamatório (seta preta) e hemorragias. B – grupo 4: glomérulo (G) desorganizado. C (grupo 3) e D (grupo 4): Túbulos (T) dilatados. .... 45

Figura 10: Baço de ratinhos do grupo 1 (controlo negativo), HE. A – Polpa vermelha (\*) e polpa branca (⇒), 40x. B – Trabécula de tecido conjuntivo (↖), macrófagos (→), 400x. C – Cápsula de tecido conjuntivo (seta a negro); 400x ..... 46

Figura 11: Baço de ratinhos dos grupos administrados com EE de *S. perennis* subsp. *Perennis* (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia), HE. A (grupo 3) e D (grupo 4): Polpa vermelha (\*) e polpa branca (⇒), 40x. B (grupo 3) e E (grupo 4): Trabécula de tecido conjuntivo (↖), macrófagos (→), 400x. C (grupo 3) e F (grupo 4): Cápsula de tecido conjuntivo (seta preta), 400x ..... 47

Figura 12: Baço de ratinhos do grupo 2 (controlo positivo), HE. A – polpa branca (⇒), polpa vermelha (\*), dilatação dos seios (↖); 40x. B – Ausência de trabéculas de tecido conjuntivo e macrófagos, 400x. C – Infiltrado inflamatório na cápsula (seta preta), 400x. 48

Figura 13: Baço de ratinhos dos grupos pré-tratados com EE de *S. perennis* subsp. *perennis* (grupo 5: 0,5 mg/mL/dia e grupo 6: 2,0 mg/mL/dia) e CCl<sub>4</sub> na dose de 0,5ml/Kg, 24 horas antes do sacrifício, HE. A (grupo 3) e D (grupo 4): polpa vermelha (\*) e polpa branca (⇒), 40x. B (grupo 3) e E (grupo 4): macrófagos (→), 400x. C (grupo 3) e F (grupo 4): cápsula de tecido conjuntivo (seta preta) e trabécula de tecido conjuntivo (↖), 400x. 49

Figura 14: Testículo de ratinho do grupo 1 (controlo negativo), HE: Túbulo seminífero com morfologia normal, espaço intersticial (\*), espermatídes (↖), 400x. .... 50

Figura 15: Testículo de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia), HE. A – grupo 3: túbulos seminíferos desorganizados (+), 400x. B – túbulo seminífero com células imaturas em degenerescência no lúmen (→), 1000x. .... 51

Figura 16: Testículo de ratinhos do grupo 2 (controle positivo), HE. A – túbulos seminíferos desorganizados com células imaturas nos lúmens (+), 400x. B – túbulo seminífero com células em degenerescência (→), 1000x. .... 52

Figura 17: Testículo de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia) e CCl<sub>4</sub> na dose de 0,5ml/Kg, 24 horas antes do sacrifício, HE. A – grupo 3: vacúolos (⇒), 400x; B - grupo 4: túbulo seminífero com células imaturas no lúmen (+), 400x; C – grupo 3: degenerescência tubular, 1000x. D – grupo 4: túbulo seminífero desorganizado e com células imaturas no lúmen (+), 400x; E (grupo 3) e F (grupo 4): túbulo com células em degenerescência (→), 1000x..... 53

Figura 18: Epidídimo de ratinhos do grupo 1 (controle negativo), HE. A – Ductos epididimários com morfologia normal (\*) B - ducto epididimário com espermatozoides no lúmen, 1000x..... 54

Figura 19: Epidídimo de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia), HE. A – grupo 3: ductos epididimários desorganizados (✧), 400x. B – grupo 3: epitélio do ducto vacuolizado (⇒), 1000x. C – grupo 4: células imaturas no lúmen do ducto (+), 1000x..... 55

Figura 20: Epidídimo de ratinhos do grupo 2 (controle positivo), HE. A – ducto epididimário com epitélio desorganizado (⇒) e infiltrado inflamatório (+), 400x. B – ducto epididimário com células imaturas no lúmen (→),1000x..... 56

Figura 21: Epidídimo de ratinhos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia) e CCl<sub>4</sub> na dose de 0,5ml/Kg, 24 horas antes do sacrifício, HE. A – grupo 3: células imaturas nos lúmens (→),1000x; B - grupo 4: ductos epididimários com epitélio desorganizado (⇒), 400x..... 56

## Índice de tabelas

Tabela 1: Análise semi-quantitativa das alterações histológicas dos órgãos em estudo ..	32
Tabela 2: Concentração dos compostos (mg/g) analisados em cada fração .....	33
Tabela 3: Evolução do peso dos ratinhos ao longo da experiência .....	35
Tabela 4: Rácios dos pesos dos órgãos em cada grupo .....	36
Tabela 5: Análise semi-quantitativa das lesões histológicas no fígado .....	41
Tabela 6: Análise semi-quantitativa das alterações histológicas no rim .....	45
Tabela 7: Análise semi-quantitativa das alterações histológicas no baço .....	49
Tabela 8: Análise semi-quantitativa das alterações histológicas no testículo .....	54
Tabela 9: Análise semi-quantitativa das alterações histológicas no epidídimo .....	57
Tabela 10: Efeitos do EE de <i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i> em enzimas marcadoras de função hepática em ratinhos expostos ao CCl <sub>4</sub> .....	58
Tabela 11: Cruzamento dos resultados histológicos e bioquímicos em cada ratinho dos grupos expostos ao CCl <sub>4</sub> .....	59

## Siglas e abreviaturas

(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>): oxigénio singuleto

(HO•): radical hidroxilo

(O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>): anião superóxido

ABTS<sup>•+</sup>: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

CCl<sub>3</sub>•: radical triclorometil

CCl<sub>3</sub>O•: radical triclorometilperoxil

CCl<sub>4</sub>: tetracloreto de carbono

EE: extrato etanólico

GC-FID: cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

HE: Hematoxilina-Eosina

IgM: Imunoglobulina M

MFF: *m*-fenilfenol

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: carbonato dissódico

NaBH<sub>4</sub>: borohidreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NH<sub>3</sub>: amónia

-OH: grupo hidroxilo

RIE: resíduo insolúvel em etanol

ROO•: radicais peroxilo

ROS: espécies reativas de oxigén

# I. Introdução

## I.1. Fitoterapia

As plantas têm importância na medicina há milhares de anos. Ainda hoje, a Organização Mundial da Saúde estima que entre 65% a 80% da população mundial ainda depende da medicina tradicional, nomeadamente medicamentos elaborados à base de ervas, nos cuidados de saúde (Koh e Woo, 2000; Nainwal *et al*, 2011). As plantas também estão na origem de muitos medicamentos modernos. Estima-se que aproximadamente um quarto dos medicamentos prescritos contém extratos de plantas ou constituintes ativos obtidos de produtos vegetais (Nainwal *et al*, 2011).

Os produtos fitofarmacêuticos são drogas autorizadas e são testados quanto à sua qualidade, eficácia e efeitos colaterais. A razão para a realização contínua de estudos científicos rigorosos em fitoterapia deve-se à necessidade de compreender melhor as suas propriedades, mecanismos, efeitos farmacológicos em humanos e animais, interação com outras drogas, eficácia e efeitos colaterais (Beer, 2011).

Geralmente os produtos fitofarmacêuticos apresentam menos efeitos colaterais e segundo pesquisas, são preferidos por cerca de 80% da população em relação aos medicamentos fabricados com químicos sintéticos (Beer, 2011).

O conhecimento do mecanismo farmacológico de plantas medicinais constitui um desafio distinto do estudo de drogas sintéticas. Por exemplo, estas últimas são estudadas isoladamente, enquanto as plantas medicinais, muitas vezes, contêm várias substâncias ativas que atuam em sinergia (Spinella, 2002). Alguns estudos demonstram que doses maiores ou menores, de produtos fitofarmacêuticos podem produzir efeitos distintos (Yong e Loh, 2004). Podem ainda ocorrer interações significativas, que não são evidentes quando os constituintes de uma planta são estudados de forma isolada. Noutros casos, um mecanismo predominante pode ser potencializado por mecanismos menos relevantes (Spinella, 2002; Yong e Loh, 2004). A planta medicinal, para além do

ou dos constituintes ativos, possui um número elevado de outros compostos que podem influenciar a sua ação. Estes compostos, em muitos casos, protegem os constituintes ativos de alterações, como oxidações, hidrólises, ou outras, podendo até permitir uma melhor absorção pelo organismo, ao facilitarem a passagem de membranas ou ao inibirem sistemas enzimáticos (Cunha *et al*, 2006). Assim, alguns medicamentos à base de plantas podem produzir uma resposta mais favorável quando é administrado um extrato em vez de um constituinte isolado. No entanto, as vantagens dos constituintes isolados *versus* extratos devem ser considerados caso a caso (Spinella, 2002).

Cada extrato de planta é único nas suas propriedades, e depende da qualidade do material vegetal e do método de extração utilizado. Sendo assim, a standardização é muito importante. Geralmente os extratos utilizados em fitoterapia contêm várias substâncias desconhecidas. Um mesmo extrato pode conter várias frações diferentes com efeitos sinérgicos, antagonistas e tóxicos. A diversidade de ação (pleiotropia) é outra característica dos extratos, que podem atuar benéficamente na doença, a vários níveis (Beer, 2011).

As plantas medicinais e produtos fitoterapêuticos devem ser seguros para o consumidor. Contudo, as plantas podem ser contaminadas por diversos agentes, como por exemplo microrganismos, metais pesados e resíduos de pesticidas. Para prevenir a contaminação e garantir a segurança e conformidade com as normas de qualidade, estes devem ser incluídos num quadro regulamentar apropriado (Alwakeel, 2008; Kosalec *et al*, 2009)

## **I.2 Propriedades químicas e efeitos terapêuticos das plantas medicinais**

As plantas produzem metabolitos primários e secundários. Os primários são moléculas presentes em todas as células da planta, sendo necessárias à vida. São exemplos os açúcares, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos. Os metabolitos secundários, em contraste, restringem-se na sua distribuição, tanto no interior da planta, como entre diferentes espécies. Em tempos considerados



produtos sem valor, hoje sabe-se que os metabólitos secundários desempenham diversas funções nas plantas. Alguns promovem proteção contra raios ultravioleta, outros contra insetos e bactérias e outros ainda contribuem para a polinização e dispersão de sementes (Raven *et al*, 1999; Daniel, 2006). Os efeitos terapêuticos das plantas medicinais correlacionam-se com as suas propriedades químicas. Estas acumulam e sintetizam substâncias naturais fisiologicamente ativas. Glicosídeos, polissacarídeos e metabólitos secundários (alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos), têm tido um crescente interesse na medicina pelos seus efeitos terapêuticos (Raven *et al*, 1999; Lovkova *et al*, 2001; Cunha *et al*, 2006; Daniel, 2006).

### **I.3. Propriedades antioxidantes das plantas medicinais**

Evidências demonstraram o papel determinante das espécies reativas de oxigénio (ROS), como por exemplo os radicais peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ), o radical hidróxilo ( $\text{HO}\cdot$ ), o anião superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) e o oxigénio singuleto ( $^1\text{O}_2$ ) na fisiopatologia do envelhecimento e em várias doenças, tais como o cancro, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer e de Parkinson (Davies, 2000; Finkel e Holbrook, 2000).

As células possuem um sistema protetor de antioxidantes que evita a formação excessiva e permite a inativação de ROS. Os antioxidantes protegem contra os danos provocados pelo stress oxidativo, que é o resultado de um desequilíbrio entre a formação de ROS e as defesas antioxidantes do organismo. Recentemente, tem aumentado consideravelmente o interesse em encontrar antioxidantes naturais para uso alimentar devido ao seu potencial na promoção da saúde e prevenção de doenças, pela sua segurança e aceitabilidade por parte do consumidor (Gorinstein *et al*, 2003).

Nos últimos anos as plantas medicinais têm sido extensivamente estudadas, em busca de novas fontes de antioxidantes. As plantas podem conter uma grande variedade de moléculas inibidoras de radicais livres, como compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, quinonas, cumarinas, lenhinas,

estilbenos, taninos), compostos nitrogenados (alcalóides, aminas, betalaínas), vitaminas, terpenóides, e outros metabolitos endógenos com capacidade antioxidante (Larson, 1988; Cotellet *et al*, 1996; Velioglu *et al*, 1998; Zheng e Wang, 2001; Cai *et al*, 2003). Contudo são os compostos fenólicos que mais contribuem para essa atividade (Velioglu *et al*, 1998; Zheng e Wang, 2001; Sun *et al*, 2002; Daniel, 2006). A relação entre a atividade antioxidante e a estrutura química de alguns compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e taninos) tem sido estudada. Em geral a capacidade de inativar ROS depende principalmente do número e posição do grupo hidroxilo dador de hidrogénio no anel aromático dos compostos fenólicos (Rice-Evans *et al*, 1999; Son e Lewis, 2002; Pandey e Rivzi, 2009).

#### **I.4. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos incluem uma grande classe de fitoquímicos. Todos contêm pelo menos um anel benzénico ligado a um grupo hidroxilo (-OH). Estes compostos são classificados, principalmente, com base no número de átomos de carbono que contêm e nas vias biossintéticas pela qual cada grupo deriva (Raven *et al*, 1999; Daniel, 2006). Ocorrem principalmente em formas conjugadas, com um ou mais resíduos de açúcar ligados a grupos hidroxilo, embora ligações diretas do açúcar (polissacarídeo ou monossacarídeo) a um carbono aromático também ocorram (Kondratyuk *et al*, 2004). Existem sob formas hidrossolúveis, quando associados à glucose, galactose, arabinose, ramnose, apiose, ácidos glucorónico e galacturónico, localizando-se em vacúolos celulares, ou sob formas poliméricas menos polares (lenhinas) situadas na parede celular (Harbone, 1989; Daniel, 2006). Os compostos fenólicos estão presentes e acumulam-se em toda a planta (raízes, caules, folhas, flores e frutos), tendo sido já identificados mais de 8000 em várias espécies. As principais classes incluem os ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lenhinas (Pandey e Rivzi, 2009). Embora sejam os metabolitos secundários mais estudados, a função de muitos deles permanece desconhecida (Raven *et al*, 1999). Alguns compostos fenólicos apresentam vários

efeitos biológicos benéficos, incluindo antibacterianos, anti-inflamatórios, antialérgicos, hepatoprotetores, antitrombóticos, antivirais, anticarcinogénicos, cardioprotetores e vasodilatadores (Tapas *et al*, 2008, Pandey e Rivzi, 2009).

### **I.5. *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis***

*S. perennis* (Miller) A.J. Scott subsp. *perennis* é uma planta perene pertencente à família Chenopodiaceae (Fig.1). É um subarbusto ramificado de até 20 cm de altura, muito prostrado e radicante. Os caules geralmente são amarelados, flexíveis e flexuosos, com segmentos claramente carnudos. As folhas reduzem-se a uma escama aguda, de margem hialina. A inflorescência é espiciforme, lateral ou terminal, e é formada por 3 flores na axila de cada bráctea. A parte fértil é constituída por brácteas opostas, soldadas, similares às folhas. A flor central, com perianto carnudo, é formada pela fusão de 4 tépalas e é ligeiramente maior que as laterais. A espiga florífera apresenta 2,5 a 4,5 mm de diâmetro. O fruto é um aquénio incluso no perianto frutífero. As sementes são pardas e a testa apresenta pelos curtos e curvados. O período de floração decorre entre agosto e novembro. Apresenta-se em zonas geralmente banhadas por água do mar, pelo menos durante a maré alta, como sapais, margens das salinas e pântanos. Distribui-se pela Europa e região mediterrânica. Em Portugal pode ser encontrada na Beira Litoral, Algarve, Estremadura e Minho (Castroviejo *et al*, 1990).



Figura 1: *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* (Sapal de Verdemilho da ria de Aveiro)

Há relatos de que elevadas concentrações de água do mar no meio de crescimento melhoram o valor nutricional de *Sarcocornia* spp. Num estudo em que foram utilizados dois ecótipos de *Sarcocornia*, foi demonstrado que os teores de compostos fenólicos,  $\beta$ -carotenos e ureídeos, conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes, aumentam com o aumento da percentagem de água do mar no meio de irrigação (Ventura, 2011). Entretanto, os efeitos terapêuticos desta planta ainda permanecem desconhecidos.

Estudos relatam que algumas plantas da mesma família (Chenopodiaceae) possuem efeitos biológicos benéficos. Diferentes extratos ou compostos de *Salicornia herbacea* apresentaram propriedades imunomoduladoras, antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-hiperlipidémicas e anti-diabéticas. (Im *et al*, 2006; Rhee *et al*, 2009). Extratos de *Atriplex confertifolia* demonstraram efeitos citotóxicos, apresentando bioatividade contra linhagens celulares do cancro da mama e células cervicais cancerígenas (Capua *et al*, 2010). Prasad e seus colaboradores (2009) relataram que os óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides* possuem propriedades anti-virais. Num estudo, é sugerida a utilização de *Chenopodium ambrosioides* como anti-parasitário, visto que extratos desta planta demonstraram atividade nematicida (Wabo, 2011). As sementes de *Chenopodium quinoa* reduziram os efeitos adversos exercidos pela frutose no perfil lipídico e nos níveis de glucose, em ratos. (Paško *et al*, 2010). O pré-tratamento com um extrato de *Spinacia oleracea* demonstrou atividade radioprotetectora, reduzindo as alterações bioquímicas nos testículos de ratinhos expostos a radiação gamma (Sisodia *et al*, 2008). Foi observado, em ratos, que o extrato de metanol e acetona de *Chenopodium album* conseguiu amenizar as alterações bioquímicas e histológicas induzidas pelo paracetamol (Pal *et al*; 2011). Já o extrato etanólico de raízes de *Beta vulgaris*, apresentou atividade hepatoprotetora contra a hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) em ratos (Agarwal *et al*. 2006).

## **I.6. Tetracloreto de carbono**

O metabolismo do tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) é um sistema modelo para os estudos toxicológicos e tem sido amplamente utilizado para avaliar a capacidade dos antioxidantes inibirem radicais livres in vivo.

O  $\text{CCl}_4$  é metabolizado pelo citocromo P450, no retículo endoplasmático e mitocôndrias, formando um radical livre altamente reativo. Numa primeira fase, o  $\text{CCl}_4$  é convertido no radical triclorometil ( $\text{CCl}_3\bullet$ ), seguindo-se o radical triclorometilperoxil ( $\text{CCl}_3\text{O}\bullet$ ). Os radicais livres participam em numerosos eventos, como ligações covalentes a lípidos, proteínas, nucleótidos, assim como na peroxidação lipídica. O radical  $\text{CCl}_3\text{O}\bullet$ , formado quando o radical  $\text{CCl}_3\bullet$  reage com o oxigênio, é o principal iniciador da peroxidação lipídica (Hodgson e Levi, 2004; Rubin, 2006; Deshwal et al, 2011). No rato, a administração de uma dose única de  $\text{CCl}_4$  induz necrose centrolobular e esteatose no fígado no espaço de 24 horas (Deshwal et al, 2011). A necrose é mais acentuada nas células centrolobulares, dado que estas contêm altas concentrações da isoenzima P450 (Haschek e Rousseaux, 1998; Hodgson e Levi, 2004). Para além do fígado, o  $\text{CCl}_4$  provoca lesões graves nos rins, nomeadamente necrose tubular (Haschek e Rousseaux, 1998; Rubin, 2006).

Alguns trabalhos demonstraram a ocorrência de várias alterações histológicas provocadas pelo  $\text{CCl}_4$  noutros órgãos como o baço (Oliveira, 2009; Silva, 2009; Lopes, 2010) testículo e epidídimo (Oliveira, 2009; Rodrigues et al, 2011).

## **I.7. Órgãos em estudo**

Seguidamente faz-se uma abordagem aos órgãos que foram objeto do presente estudo, relativamente à sua suscetibilidade a xenobióticos. No caso específico do fígado, um dos órgãos mais suscetíveis e mais utilizado em estudos de toxicidade, incide-se ainda nos parâmetros bioquímicos para análise de hepatotoxicidade. É feita também uma breve referência aos numerosos estudos que têm sido realizados nos últimos anos, na busca de constituintes hepatoprotetores de fontes naturais.

### **I.7.1. Fígado**

O fígado é o principal local de desintoxicação de xenobióticos, como fármacos, substâncias químicas industriais e contaminantes ambientais (Rubin, 2006).

Quando animais de laboratório são expostos a xenobióticos, as respostas tóxicas ocorrem mais frequentemente no fígado do que noutros órgãos (Haschek e Rousseaux, 1998). A sua localização anatómica, assim como o seu papel na biotransformação, contribuem para a suscetibilidade do fígado a agentes químicos. Numerosos xenobióticos entram no organismo através do trato gastrointestinal e, após absorção, são transportados pela veia porta hepática para o fígado. Após “filtração” no fígado, o sangue segue para os pulmões e circulação geral. O fígado é, portanto, o primeiro órgão a entrar em contacto com as substâncias químicas absorvidas no intestino. Recebe cerca de 30% do débito cardíaco e cerca de 10 a 15% do volume total de sangue está sempre presente neste órgão. Por esta razão, qualquer medicamento ou produto químico entra em contacto com o mesmo (Roberts *et al*, 2000; Hodgson e Levi, 2004).

Um segundo fator que contribui para a suscetibilidade do fígado a lesões provocadas por tóxicos é a presença de altas concentrações de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, principalmente as do sistema de monooxigenases dependentes do citocromo P450 (Roberts *et al*, 2000; Hodgson e Levi, 2004).

#### **I.7.1.1 Parâmetros bioquímicos para análise de hepatotoxicidade**

Quando a membrana plasmática das células hepáticas é danificada, uma variedade de enzimas são libertadas na corrente sanguínea. A necrose ou outras lesões que afetem as membranas celulares fazem com que as transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) sejam libertadas na circulação, sendo possível a sua medição no soro. Estas enzimas são marcadores quantitativos úteis da extensão e tipo de lesão hepatocelular. Valores elevados de AST e ALT indicam lesão celular. A AST é uma enzima

mitocondrial presente em elevados teores no coração, fígado, músculo-esquelético e rim. Os seus níveis aumentam quando estes tecidos são lesados. A ALT é uma enzima citosólica presente nos hepatócitos, sendo mais específica para o fígado e, um melhor parâmetro para a deteção de lesões hepáticas (Roberts *et al*, 2000).

#### **I.7.1.2 Extratos de plantas com atividade hepatoprotetora**

A toxicidade ao nível do fígado tem aumentado devido a várias toxinas ambientais e drogas hepatotóxicas (Jin *et al*, 2005). Devido à ausência de drogas hepatoprotetoras eficientes na medicina moderna, um grande número de estudos têm sido realizados nos últimos anos, em busca de constituintes hepatoprotetores de fontes naturais (Adnyana *et al*, 2001; Huang *et al*, 2009). Extratos de várias plantas, demonstraram ter propriedades hepatoprotetoras, reduzindo os efeitos nocivos, a nível morfológico e/ou bioquímico, induzidos por diversas substâncias tóxicas, nomeadamente o CCl<sub>4</sub> (Adewusi e Afolayan, 2010). Por exemplo, o tratamento com *Wedelia calendulacea* demonstrou uma redução, dependente da dose, dos valores elevados de AST e ALT, induzidos pelo CCl<sub>4</sub>, indicando que o extrato preserva a função hepática (Murugaian, 2008). O extrato etanólico de *Coriandrum sativum* apresentou hepatoproteção, reduzindo o peso do fígado, as actividades da AST e ALT, a esteatose e a necrose, em ratos intoxicados com CCl<sub>4</sub> (Pandey *et al*, 2011). Já o extrato aquoso de *Aspalathus linearis* provocou uma diminuição da esteatose e cirrose induzidas pelo CCl<sub>4</sub> (Ulicná *et al*, 2003).

#### **I.7.2. Rins**

Com a produção de urina nos rins, são eliminados diversos resíduos do metabolismo endógeno, do metabolismo de xenobióticos e água (Rubin, 2006). Diversos fatores estão envolvidos na sensibilidade do rim a numerosas substâncias tóxicas. O fluxo arterial renal e o aumento da concentração de produtos de excreção após a reabsorção de água do líquido tubular,

desempenham um papel importante para esta suscetibilidade. Embora os rins representem menos de 1% da massa corporal, recebem cerca de 25% do débito cardíaco. Assim, quantidades significativas de produtos químicos exógenos e/ou os seus metabolitos passam pelo rim. Um segundo fator importante que afeta a sensibilidade dos rins a produtos químicos é a sua capacidade para concentrar o líquido tubular e, como consequência, após a remoção de água e sais, concentrar todos os produtos químicos que este contém. Assim, uma concentração não tóxica no plasma pode ser convertida para uma tóxica no fluido tubular. Tal como no fígado, embora em menor quantidade, algumas regiões do rim apresentam níveis consideráveis de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, especialmente citocromos P450 na *pars recta* do túbulo proximal, uma região particularmente suscetível a danos químicos (Middendorf e Williams, 2000; Hodgson e Levi, 2004).

#### **I.7.4. Baço**

O baço é um órgão envolvido na resposta imunitária. No baço de mamíferos podem ser definidos vários compartimentos com diferenças morfológicas e fisiológicas: as polpas branca e vermelha. Os linfócitos T e B da polpa branca, como parte do sistema linfático periférico, têm uma função imunológica para o sistema circulatório que se compara à função imunológica dos nódulos linfáticos. A polpa branca é fonte de proteção contra microrganismos que penetram no sangue circulante, é o principal local para a síntese do anticorpo IgM e de produção de linfócitos e plasmócitos. A polpa vermelha é um filtro. Separa e elimina as células anómalas ou estranhas. Os eritrócitos senescentes e danificados são reconhecidos e fagocitados pelos macrófagos esplénicos (Rubin, 2006).

O sistema imunitário é muito complexo. Por esta razão, a avaliação dos potenciais efeitos imunotóxicos de drogas, produtos químicos e outros agentes não é uma tarefa simples. Cada vez mais, há a percepção de que o sistema imunológico pode estar entre os mais sensíveis à toxicidade de muitos produtos químicos e, como resultado, merece atenção especial. Há evidências de



que alguns xenobióticos podem causar supressão imunológica, agravar a reação alérgica e ter algum envolvimento na doença auto-imune (Roberts e Adams, 2000; Selgrade, 2004).

#### **I.7.5. Testículo e epidídimo**

O sistema reprodutor masculino envolve os testículos, os epidídimos, as glândulas sexuais acessórias e as suas hormonas associadas (Rubin, 2006).

O processo de produção de células germinativas no sexo masculino, a espermatogénese, fornece exemplos claros de como as células podem ter uma suscetibilidade aumentada para certas substâncias tóxicas. Na espermatogénese, as células germinativas formam-se a partir de células estaminais indiferenciadas, através de uma série de divisões mitóticas e meióticas que, eventualmente, produzem um grande número de espermatozóides. Estes transitam do lúmen dos túbulos seminíferos para os ductos epididimários. O sémen é formado pela mistura de espermatozóides nas secreções epididimárias com os fluidos produzidos pelas glândulas acessórias (Demott e Borgert 2000; Rubin, 2006). A elevada taxa de divisão celular e a atividade metabólica associada à espermatogénese conferem suscetibilidade a certos tipos de danos. Durante a duplicação do material genético e divisão celular, o ADN é particularmente vulnerável (Demott e Borgert, 2000).

Durante a espermatogénese a barreira hemato-testicular protege as células germinativas de lesões causadas por fatores intrínsecos e extrínsecos. No entanto, esta barreira é vulnerável a fatores ambientais, como o estilo de vida, drogas, poluição e toxinas (D´Cruz *et al*, 2010; Cheng e Mruk, 2011).

Numerosos estudos demonstraram que várias plantas e produtos derivados de plantas podem afetar a funcionalidade dos testículos, conduzindo à infertilidade (D´Cruz *et al*, 2010).

## I.8. Enquadramento do trabalho e objetivos

O presente trabalho vem no seguimento de vários estudos, realizados no Laboratório de Histologia Animal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, sobre os efeitos de extratos de plantas em diversos órgãos de ratinhos intoxicados com  $\text{CCl}_4$  (Oliveira, 2009; Silva, 2009; Lopes, 2010; Rodrigues *et al*, 2011). Neste sentido, e com o interesse de estudar as propriedades de plantas da flora portuguesa, e por não haver ainda bibliografia disponível sobre os efeitos de extratos de *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* em ratinhos, surgiu este trabalho, cujos objetivos foram:

- a) Submeter a planta a uma extração em etanol e realizar uma análise de açúcares e compostos fenólicos nas frações obtidas, assim como a atividade antioxidante dos compostos presentes
- b) Avaliar os efeitos do extrato, através da análise histopatológica do fígado, rim, baço, testículo e epidídimo;
- c) Avaliar os possíveis efeitos protetores do extrato, após administração de  $\text{CCl}_4$  em ratinhos, através da análise histopatológica dos mesmos órgãos e pela avaliação bioquímica da função hepática.
- d) Inferir sobre as potencialidades desta espécie na fitoterapia.

## **II - Material e Métodos**

### **II.1. Colheita e análise de compostos em *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis***

Porções aéreas de *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*, em fase vegetativa, foram colhidas a 17 de Janeiro de 2011, no sapal de Verdemilho (40°37'22N; 8°39'40W) da ria de Aveiro. Já no Laboratório de Bioquímica e Química Alimentar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, fez-se a separação dos caules carnudos e de seguida procedeu-se à lavagem do material em água corrente, sendo a última passagem por água destilada. O material vegetal obtido foi sujeito a uma extração em etanol, obtendo-se assim o extrato etanólico (EE) e o resíduo insolúvel em etanol (RIE). Em ambas as frações foram analisados os açúcares e os compostos fenólicos. Foi ainda determinada a atividade antioxidante do EE.

### **II.2. Extração em etanol**

Cerca de 900 g de caules carnudos de *S. perennis* subsp. *perennis* foram triturados e fervidos em etanol a 95%, numa proporção de 1:5 (v/v), durante 10 minutos. Após filtração num pano de nylon, o EE obtido foi concentrado, a pressão reduzida, num evaporador rotativo (Rotavapor R-114, Buchi) e, seguidamente liofilizado em liofilizadores BenchTop, Virtis. O RIE obtido após filtração, no procedimento anterior, permaneceu a secar, à temperatura ambiente, até ao dia seguinte.

### **II.3. Análise de açúcares neutros**

Os teores de açúcares neutros das duas frações (EE liofilizado e RIE) foram obtidos por hidrólise ácida, seguida de redução e posterior acetilação. A análise dos açúcares resultantes foi realizada por cromatografia em fase gasosa (GC-FID) (Coimbra *et al*, 1996; Selvendran *et al*, 1979).

Prepararam-se 3 amostras de EE e 4 de RIE. Duas das amostras de RIE não foram submetidas ao tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%, durante 3 horas, para ser possível distinguir a glucose celulósica da não celulósica.

#### **II.3.1. Hidrólise**

Em tubos de cultura, a cerca de 2 mg de cada amostra foram adicionados 200µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%, seguindo-se uma incubação, à temperatura ambiente, durante 3 horas, com recurso a duas ou três agitações durante esse período. Posteriormente, foram adicionados 2,2 mL de água destilada, procedendo-se à hidrólise a 100°C, num bloco de aquecimento, durante 2,5 horas. Após 1 hora, os tubos foram colocados num banho de água fria, tendo sido retirados 0,5 mL de hidrolisado para análise de ácidos urónicos. A hidrólise continuou por mais 1,5 horas. Finalmente, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo.

#### **II.3.2. Redução e acetilação**

Após a adição de 200 µL de padrão interno (2-desoxiglucose 1mg/mL), foram transferidos 0,5 mL de cada amostra para um novo tubo de cultura, os quais foram neutralizados com 200 µL de NH<sub>3</sub> a 25%. Procedeu-se à redução, com a adição de 100 µL de NaBH<sub>4</sub> (15% (m/v) em NH<sub>3</sub> 3 M) e incubação num bloco de aquecimento, a 30°C, durante 1 hora. As amostras foram arrefecidas num banho de gelo, e foram adicionados, duas vezes, 50 µL de ácido acético glacial a cada uma. Posteriormente, 300 µL de cada amostra foram transferidos para tubos SOVIREL, sendo, de seguida, adicionados 450 µL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético. Após agitação, os tubos foram incubados num bloco de

aquecimento, a 30°C, durante 30 minutos. Seguidamente, num banho de gelo, foram adicionados 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano, seguindo-se uma forte agitação. As amostras foram centrifugadas cerca de 30 segundos a 3000 rpm, seguindo-se uma aspiração da fase aquosa por sucção. Adicionou-se novamente 3 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano, repetindo-se o mesmo procedimento. Seguidamente, adicionou-se 3 mL de água destilada seguindo-se novamente a agitação, a centrifugação e a aspiração total da fase aquosa por sucção. Este procedimento foi repetido, tendo o cuidado de se aspirar totalmente a fase aquosa, sem deixar água na parede dos tubos. A fase orgânica de cada amostra foi transferida para tubos próprios para um evaporador centrífugo (UNIVAPO 100H), e neste foi evaporado o diclorometano. De seguida, foram adicionados 1 mL de acetona anidra às amostras e voltou-se a evaporar. Procedeu-se à repetição deste procedimento.

### **II.3.3. Análise por GC-FID**

Os acetatos de alditol obtidos foram dissolvidos com 50 µL de acetona anidra e analisados por GC-FID, no cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400 (CR1), usando uma coluna capilar DB-225 (30 m de comprimento, 0,25 de diâmetro, 0,15 µm de espessura).

## **II.4. Análise de ácidos urónicos**

A análise de ácidos urónicos das duas amostras (EE liofilizado e RIE) foi realizada pelo método colorimétrico modificado do *m*-fenilfenol (Coimbra *et al*, 1996; Selvendran *et al*, 1979).

A hidrólise foi realizada simultaneamente com a análise de açúcares neutros, tal como indicado em II.3.1. Durante a hidrólise para análise de açúcares neutros, após 1 hora, foram retirados 0,5 mL de hidrolisado, de cada amostra, para um porta amostras, para análise de ácidos urónicos. Os 0,5 mL de hidrolisado foram diluídos com 3 mL de água destilada.

A curva de calibração foi preparada utilizando ácido galacturónico como padrão, numa série de 5 concentrações de 0 a 98 µg/mL, tendo sido preparadas 3 réplicas de cada concentração. Foram preparados 3 tubos para cada amostra (1 branco e 2 réplicas) com 0,5 mL de amostra. Estes, assim como os 15 tubos dos padrões, foram colocados num banho de gelo e foi adicionado a cada um 3 mL de borato de sódio 50 mM, preparado com ácido sulfúrico concentrado. De seguida, os tubos foram muito bem agitados, tapados com papel de alumínio e colocados num banho a 100°C, durante 10 minutos. Após esse tempo, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo. Adicionou-se, no escuro, 100 µL de MFF (*m*-fenilfenol 0,15% (m/v) em 0,5% (m/v) NaOH) a 2 dos 3 tubos de cada amostra e padrão (réplicas). Os tubos foram agitados e permaneceram no escuro durante 30 minutos. A leitura da absorvância de cada tubo foi feita a 520 nm num espectrofotómetro (6405 Jenway UV- vis spectrophotometer).

## **II.5. Determinação de compostos fenólicos (equivalentes em ácido gálico)**

A determinação de compostos fenólicos nas duas amostras (EE liofilizado e RIE), em equivalentes de ácido gálico, foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Folin e Ciocalteu, 1927).

As amostras foram dissolvidas em água destilada, numa concentração de 1mg/mL. A 0,125 mL das soluções obtidas, foram adicionados 0,5 mL de água destilada e 0,125 mL de reagente Folin-Ciocalteu. Após uma homogeneização no vórtex, as amostras reagiram durante 5 minutos. De seguida, foram adicionados 1,250 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g/L) e 1,0 mL de água destilada. Após uma homogeneização no vórtex, as amostras reagiram durante 90 minutos, à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 760 nm num espectrofotómetro (6405 Jenway UV- vis spectrophotometer). A curva de calibração foi preparada utilizando ácido gálico como padrão, numa série de 5 concentrações de 0 a 50 mg/mL, tendo sido preparadas 3 réplicas de cada concentração.

## **II.6. Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS**

Foi realizada a determinação da atividade antioxidante no EE liofilizado pelo método ABTS (Re *et al*, 1999).

A amostra foi diluída 5 vezes, numa série de concentrações de 0,5 a 20 mg/mL. Foi preparada uma solução de ABTS a 7mM [19,2 g de ABTS em 5 mL de persulfato de potássio (3,31 mg em 5 mL de água destilada)] que ficou a reagir no escuro, à temperatura ambiente, durante 16 horas. Seguidamente, 1mL do radical ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) foi diluído em 80 mL de água destilada. A 1mL desta solução adicionou-se 50 µL de amostra, permanecendo a reagir no escuro durante 15 minutos. A absorvância foi lida a 734 nm, num espectrofotómetro (6405 Jenway UV- vis spectrophotometer). A curva de calibração foi preparada utilizando trolox como padrão, numa série de 5 concentrações de 0 a 500 µM, tendo sido preparadas 3 réplicas de cada concentração.

## **II.7 Avaliação dos efeitos do extrato etanólico de *S. perennis* subsp. *perennis* em ratinhos**

Foram utilizados 30 ratinhos machos da estirpe ICR-CD1, com cerca de 2 semanas e pesos variando entre 28 e 43 g, os quais foram fornecidos pelo laboratório Harlan (Espanha). Estes permaneceram em aclimatização às condições do biotério do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, durante 5 dias. Os ratinhos foram mantidos em gaiolas de polycarbonato transparente, numa câmara climatizada ( $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo luz/escuridão de 12/12 horas e humidade relativa 40-60%), em conformidade com as diretivas comunitárias respeitantes ao acondicionamento temporário de pequenos mamíferos (Decreto-Lei n.º 129/92, de 23 de Outubro). Os animais tiveram acesso a ração apropriada *ad libitum*.

### II.7.1. Administração do extrato aos animais

Os ratinhos foram divididos em 6 grupos (n=5), aos quais foram fornecidas e/ou administradas diferentes soluções, tal como apresentado seguidamente:

- **Grupo 1** (controlo negativo): água da torneira *ad libitum*;
- **Grupo 2** (controlo positivo): água da torneira *ad libitum* e administração de uma injeção com 0,25 mL de CCl<sub>4</sub> em azeite, por via subcutânea, na concentração de 0,5 mL/Kg, 24 horas antes do sacrifício;
- **Grupo 3**: EE liofilizado de *S. perennis* subsp. *perennis*, diluído na água do bebedouro, na concentração de 0,5 mg/mL/dia;
- **Grupo 4**: EE liofilizado de *S. perennis* subsp. *perennis*, diluído na água do bebedouro, na concentração de 2,0 mg/mL/dia;
- **Grupo 5**: EE liofilizado de *S. perennis* subsp. *perennis*, diluído na água do bebedouro, na concentração de 0,5 mg/mL/dia e administração de uma injeção com 0,25 mL de CCl<sub>4</sub> em azeite, por via subcutânea, na concentração de 0,5 mL/Kg, 24 horas antes do sacrifício;
- **Grupo 6**: EE liofilizado de *S. perennis* subsp. *perennis*, diluído na água do bebedouro, *ad libitum*, na concentração de 2,0 mg/mL/dia e administração de uma injeção com 0,25 mL de CCl<sub>4</sub> em azeite, por via subcutânea, na concentração de 0,5 mL/Kg, 24 horas antes do sacrifício.

As soluções preparadas com EE liofilizado foram renovadas diariamente. A experiência teve uma duração de 30 dias e durante este período foi observado o comportamento e procedeu-se à pesagem regular dos animais. Após o sacrifício, por deslocamento cervical, recolheu-se o sangue, para avaliação da função hepática, e o fígado, rins, baço, testículos e epidídimos para análise histopatológica. Foi registado o peso e também o aspeto macroscópico dos órgãos. A escolha das doses administradas e da duração do estudo basearam-se na literatura consultada (Murugesan *et al*, 2009; Dubey e Batra, 2008).



### **II.7.2. Avaliação da função hepática**

Todas as amostras de sangue foram centrifugadas numa centrífuga Hettich Zentrifugen Rotina 38 a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. As análises bioquímicas às enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram testadas no soro, num aparelho Olympus AU2700. Este procedimento foi efetuado em colaboração com o Laboratório de

Análises Clínicas AVELAB (Aveiro). Os valores das enzimas foram apresentados em U/L.

### **II.7.3. Técnicas Histológicas**

Os fragmentos do lóbulo maior do fígado, os fragmentos de baço, e o rim esquerdo de cada ratinho foram fixados em formaldeído 4% tamponado; o testículo e epidídimo esquerdos foram fixados em solução de Bouin. Os tecidos foram posteriormente desidratados numa série crescente de álcoois (etanol 70%-etanol 90%- etanol 100% e benzol), impregnados e incluídos em parafina com ponto de fusão de 56º-58ºC (Anexo 1). Realizaram-se cortes de 4 µm dos tecidos incluídos em parafina, num micrótomo Leitz 1512, que após secagem na estufa a 40ºC, durante dois dias, foram desparafinados, reidratados numa série decrescente de etanol até à água, corados com Hematoxilina-Eosina (Anexo 1) e montados em meio Eukitt® (*Vidrolab*). Os cortes foram observados ao microscópio ótico, com câmara fotográfica (Olympus BX41TF), para análise histopatológica, registando-se os aspetos mais representativos.

### **II.7.4. Análise semi-quantitativa das alterações histológicas**

Os órgãos de cada ratinho foram analisados e classificados segundo vários critérios, baseados na literatura consultada (Rubin, 2006; Nishikawa *et al*, 2010, Pandey *et al*, 2011; Rodrigues *et al*, 2011) os quais são apresentados seguidamente na Tabela 1.

**Tabela 1: Análise semi-quantitativa das alterações histológicas dos órgãos em estudo**

Alteração histológica	Critérios de análise
<b>Fígado</b>	
<b>Necrose centrolobular</b>	(+) Estende-se até metade da largura dos lóbulos hepáticos (++) Estende-se a mais de metade da largura dos lóbulos hepáticos
<b>Esteatose macrovesicular</b>	(+) Vacúolos pequenos e em menor quantidade (++) Vacúolos grandes e em maior quantidade
<b>Tumefação hidrópica</b>	(A) Localiza-se aleatoriamente (C) Circunda as áreas de necrose centrolobular
<b>Congestão das veias hepáticas</b>	(x) Presente; (-) Ausente
<b>Hemorragias</b>	(+) Consideráveis; (++) Extensas
<b>Leve inflamação</b>	(x) Presente; (-) Ausente
<b>Rim</b>	
<b>Necrose tubular</b>	(x) Presente; (-) Ausente
<b>Alteração glomerular</b>	(A) Atrofia glomerular é a mais prevalente; (x) Presente; (-) Ausente
<b>Dilatação dos túbulos</b>	(-) Ausente; (x) Presente
<b>Infiltrados inflamatórios</b>	(-) Ausentes; (x) Presentes
<b>Hemorragias</b>	(+) Consideráveis; (++) Extensas
<b>Baço</b>	
<b>Infiltrado inflamatório na cápsula</b>	(x) Presente; (-) Ausente
<b>Seios esplênicos dilatados</b>	(x) Presentes; (-) Ausentes
<b>Macrófagos</b>	(x) Presentes; (-) Ausentes
<b>Trabéculas</b>	(x) Presentes; (-) Ausentes
<b>Testículos</b>	
<b>Vacuolização dos túbulos seminíferos</b>	(+) Leve; (++) Considerável; (+++) Extensa
<b>Células imaturas nos lúmens</b>	(+) Menor quantidade de túbulos afetados; (++) Maior quantidade de túbulos afetados
<b>Células em degenerescência</b>	(+) Menor quantidade; (++) Maior quantidade
<b>Desorganização do epitélio dos túbulos seminíferos</b>	(+) Poucos túbulos afetados; (++) Alguns túbulos afetados; (+++) bastantes túbulos afetados
<b>Degenerescência dos túbulos</b>	(x) Presente, (-) Ausente
<b>Epidídimo</b>	
<b>Vacuolização dos ductos epididimários</b>	(x) Presente; (-) Ausente
<b>Células imaturas nos lúmens</b>	(+) Menor quantidade de túbulos afetados; (++) Maior quantidade túbulos afetados
<b>Desorganização do epitélio dos ductos epididimários</b>	(x) Presente; (-) Ausente

## II.8. Análise Estatística

Para a análise da estatística inferencial foi utilizado o software estatístico SPSS, versão 17.0. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para verificar se havia diferenças estatisticamente significativas nos rácios dos diferentes órgãos entre dois grupos.

Para cada teste foi considerado um nível de significância de 5%.

### III- Resultados e Discussão

#### III.1. Análise de compostos e atividade antioxidante

Os rendimentos obtidos da extração em etanol foram 8,89% (m/m) e 4,61% (m/m) relativamente ao resíduo insolúvel em etanol (RIE) e ao extrato etanólico (EE), respetivamente. As concentrações dos compostos presentes em cada fração estão indicadas na Tabela 2.

**Tabela 2: Concentração dos compostos (mg/g) analisados em cada fração**

		Frações	
		Extrato Etanólico	Resíduo Insolúvel em Etanol
Compostos	Ácidos Urónicos	2,82±4,89	322,03±3,51
	Glucose Não Celulósica	104,39±7,06	89,80±3,89
	Glucose Celulósica		68,05±2,438
	Galactose	1,88±3,25	35,35±0,14
	Manose	5,99±5,36	3,37±3,89
	Xilose	0,25±0,44	19,25±0,65
	Arabinose	0,69±1,19	123,13±6,29
	Fucose	-	1,85±0,12
	Ramnose	0,95±1,64	7,80±0,27
	Equivalentes em ácido gálico	24,30±2,43	8,90±1,04
	Equivalentes em trolox	12,30 ±2,06	*

média ± desvio padrão

(-) Ausência (\*) não foram determinados

Os polissacarídeos presentes no resíduo insolúvel em etanol (RIE) eram constituídos principalmente por ácidos urónicos. Estes resultados indicam a presença maioritária de polissacarídeos pécticos na planta, polissacarídeos principalmente formados por uma cadeia principal de resíduos de ácido galacturónico unidos por ligações  $\alpha$  1→4 (Harbone e Turner, 1986; Daniel, 2006). Existe também uma quantidade significativa de arabinose que poderá estar associada aos polissacarídeos pécticos, que usualmente são cadeias laterais de arabinanas muito ramificadas (Harbone e Turner, 1986; Daniel, 2006). Finalmente, o RIE é composto por aproximadamente 9% de glucose não celulósica e 7% de celulose. Outras halófitas da família Chenopodiaceae possuem

composição semelhante. As paredes celulares de *Salicornia ramosissima* são ricas em ácido galacturónico, arabinose e glucose (Renard *et al*, 1993).

O EE apresentou resíduos de glucose, manose, ácidos urónicos, galactose, ramnose, arabinose e xilose. Compostos fenólicos poderão estar glicosilados com alguns destes açúcares simples, os quais aparecem muitas vezes associados a glucose, galactose, arabinose, ramnose e ácidos urónicos (Harbone, 1989).

Através do método de Folin-Ciocalteu determinou-se que o EE continha  $24,30 \pm 2,43$  mg/g de equivalentes em ácido gálico. Entretanto,  $8,90 \pm 1,04$  mg/g destes compostos não foram extraídos, permanecendo no RIE. Estes corresponderão provavelmente a compostos fenólicos com formas poliméricas menos polares, como as lenhinas, situados na parede celular (Harbone, 1989). O método de Folin-Ciocalteu é um método indireto de determinação de compostos fenólicos e baseia-se no potencial antioxidante destes compostos. O reagente Folin-Ciocalteu é uma mistura de sais hexavalentes de Mo e W em meio ácido que são reduzidos a complexos de cor azul, principalmente pelos grupos hidroxilo dos compostos fenólicos (Maniati, 2007).

Pelo método ABTS determinou-se que o EE era composto por  $12,03 \pm 2,06$  mg/g de equivalentes em trolox. O método ABTS é um dos métodos mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante de extratos de plantas. O ABTS oxidado com persulfato de potássio (máximo de absorção a 734 nm) leva à formação de radicais livres ABTS. Este método baseia-se na capacidade dos antioxidantes inativarem o radical  $ABTS^{\cdot+}$  (Re *et al*, 1999).

Esta primeira parte do trabalho permitiu verificar a presença de compostos com forte atividade antioxidante (equivalentes em ácido gálico e equivalentes em trolox) no EE. O ácido gálico é um composto fenólico que devido à sua atividade antioxidante tem fortes propriedades hepatoprotetoras (Rasool *et al*, 2010). O trolox é um análogo hidrossolúvel da vitamina E. É um forte antioxidante e excelente protetor contra a lipoperoxidação (Barclay *et al*, 1995). Perante estes resultados, tornou-se promissor utilizar o EE para avaliar os possíveis efeitos protetores de *S. perennis* subsp. *perennis* em ratinhos intoxicados com  $CCl_4$ .

## III.2. Comportamento dos animais ao longo da experiência

Durante o período anterior à administração de  $\text{CCl}_4$ , todos os ratinhos apresentaram níveis de atividade e consumos de ração e de água normais. Após a administração de  $\text{CCl}_4$ , realizada 24 horas antes do sacrifício, observou-se uma quebra acentuada nos níveis de atividade, maior consumo de água, pelagem áspera e queda da mesma nos grupos 2, 5 e 6. Em trabalhos anteriores realizados no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, foram observados efeitos idênticos nos ratinhos administrados com  $\text{CCl}_4$  (Oliveira, 2009; Lopes 2010). Estes efeitos provocados pelo tóxico foram aumentando progressivamente de intensidade, durante as 24h até ao sacrifício. A taxa de sobrevivência no presente estudo foi de 100%.

## III.3. Peso corporal e rácios dos pesos dos órgãos

Observou-se um aumento gradual do peso em todos os ratinhos, desde o início até ao fim da experiência (Tabela 3), sem diferenças significativas na percentagem de peso ganho, entre os grupos. Há relatos que o  $\text{CCl}_4$  provoca diminuição do peso corporal (Pandey *et al*, 2011). Neste estudo, o tóxico foi administrado 24 horas antes do sacrifício e talvez por esse motivo não tenha sido notado esse efeito nos ratinhos. Entretanto, o tratamento com EE não teve qualquer efeito no peso corporal dos animais.

**Tabela 3: Evolução do peso dos ratinhos ao longo da experiência**

		Dias							
		1º	5º	9º	13º	17º	22º	27º	Sacrifício
Grupos (n=5)	1	31,5±2,1	33,1±2,9	36,3±2,4	36,3±2,4	39,0±1,9	40,1±2,2	40,4±2,4	42,0±3,0
	2	30,6±1,8	33,1±2,3	34,5±2,4	35,6±2,0	36,7±2,1	37,5±3,2	38,4±3,1	38,4±3,9
	3	31,1±2,4	32,7±1,6	34,9±1,0	36,0±1,7	36,9±1,1	37,8±2,4	38,6±2,5	38,6± 1,9
	4	31,8±2,3	35,1±1,8	37,8±2,1	38,5±1,6	39,2±1,7	39,6±2,4	40,5±2,9	42,4±2,4
	5	31,4±1,4	34,0±1,2	36,9±1,9	38,7±2,4	40,3±2,6	39,4±2,8	40,0±2,1	41,0±2,9
	6	30,2±1,7	34,7±1,9	36,7±1,4	37,8±2,2	38,6±2,0	40,2±2,6	41,6±3,7	41,9±3,8

**Grupo 1:** controlo negativo; **Grupo 2:** controlo positivo; **Grupo 3:** EE de *S perennis* subsp. *perennis* 0,5 mg/ml/dia; **Grupo 4:** EE de *S perennis* subsp. *perennis* 2,0 mg/ml/dia; **Grupo 5:** EE de *S perennis* subsp. *perennis* 0,5 mg/ml/dia+ $\text{CCl}_4$ ; **Grupo 6:** EE de *S perennis* subsp. *perennis* 2,0 mg/ml/dia+ $\text{CCl}_4$

Os valores dos rácios dos pesos dos órgãos estão apresentados na Tabela 4.

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre os rácios dos rins do grupo 2 (controlo positivo) e os dos restantes grupos. O  $\text{CCl}_4$  aumentou o peso do rim, enquanto o tratamento com EE, em ambas as doses (grupos 5 e 6), o diminuiu significativamente. Efeitos similares a nível dos rácios dos rins foram encontrados por Pandey e seus colaboradores (2011) ao estudarem o efeito protetor do extrato etanólico de *Coriandrum sativum* em ratos expostos ao  $\text{CCl}_4$ . No entanto, estes autores descreveram o mesmo efeito em relação ao fígado, o que não foi observado neste trabalho.

**Tabela 4: Rácios dos pesos dos órgãos em cada grupo**

		Rácios dos pesos dos órgãos							
		F	RD	RE	B	TD	TE	ED	EE
Grupos (n=5)	1	4,72±0,35	0,76±0,10	0,72±0,08	0,25±0,06	0,26±0,09	0,29±0,06	0,15±0,05	0,11±0,02
	2	5,15±1,01	<b>0,98±1,10*</b>	<b>0,94±0,11*</b>	0,24±0,05	0,30±0,05	0,30±0,04	0,14±0,04	0,13±0,03
	3	5,02±0,34	0,78±0,05	0,75±0,03	0,28±0,07	0,32±0,04	0,30±0,04	0,11±0,01	0,11±0,01
	4	4,98±0,42	0,72±0,07	0,70±0,07	0,37±0,10	0,33±0,03	0,31±0,03	0,12±0,01	0,13±0,02
	5	4,94±0,41	0,76±0,08	0,75±0,10	0,35±0,18	0,31±0,02	0,26±0,06	0,11±0,02	0,11±0,01
	6	4,86±0,29	0,75±0,06	0,73±0,09	0,32±0,08	0,33±0,04	0,24±0,06	0,12±0,02	0,12±0,01

**Grupo 1:** controlo negativo; **Grupo 2:** controlo positivo; **Grupo 3:** EE de *S. perennis* subsp. *perennis* 0,5 mg/ml/dia; **Grupo 4:** EE de *S. perennis* subsp. *perennis* 2,0 mg/ml/dia; **Grupo 5:** EE de *S. perennis* subsp. *perennis* 0,5 mg/ml/dia+ $\text{CCl}_4$ ; **Grupo 6:** EE de *S. perennis* subsp. *perennis* 2,0 mg/ml/dia+ $\text{CCl}_4$ . F: fígado; RD: rim direito; RE: rim esquerdo; TD: testículo direito; TE: testículo esquerdo; B: baço

\*diferenças estatisticamente significativas em relação aos restantes grupos ( $p<0,05$ )

### III.4. Análise macroscópica dos órgãos

Macroscopicamente, não se observaram diferenças nos órgãos entre os grupos 1, 3 e 4. No grupo 2, o fígado de todos os ratinhos apresentou algumas lesões puntiformes em toda a superfície do órgão. Para além disso, alguns apresentaram o parênquima hemorrágico com uma coloração avermelhada escura. Nos grupos 5 e 6, as lesões puntiformes não eram tão perceptíveis e observaram-se menos fígados hemorrágicos. Já em relação aos rins, não se

observaram diferenças significativas entre o grupo 2 e os grupos 5 e 6. Em todos foram observadas pequenas lesões puntiformes, tal como no fígado dos animais do grupo 2. Todos os ratinhos administrados com CCl<sub>4</sub> (grupos 2, 5 e 6) apresentaram fígado, rins e baço com uma consistência mole, principalmente os do grupo 2. Quanto ao testículo e epidídimo, não foram visíveis quaisquer alterações a nível macroscópico, entre os grupos. As lesões observadas microscopicamente estiveram de acordo com a análise macroscópica prévia. As lesões puntiformes observadas no fígado e rim de animais sujeitos ao CCl<sub>4</sub>, correspondiam às áreas de necrose observadas na histologia, em menor ou maior grau.

### III.5. Análise histológica do fígado

Os ratinhos do grupo 1 (controlo negativo) apresentaram um parênquima hepático normal, com os cordões de hepatócitos, veias centrais e espaços porta com morfologia típica (Fig. 2).

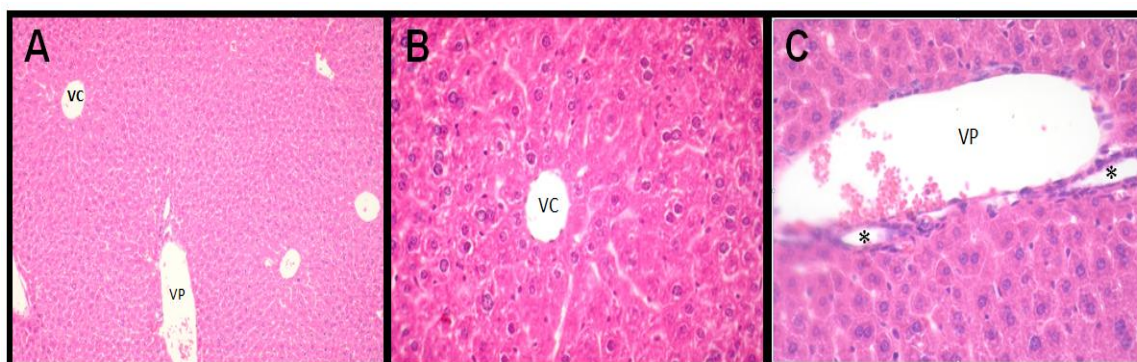
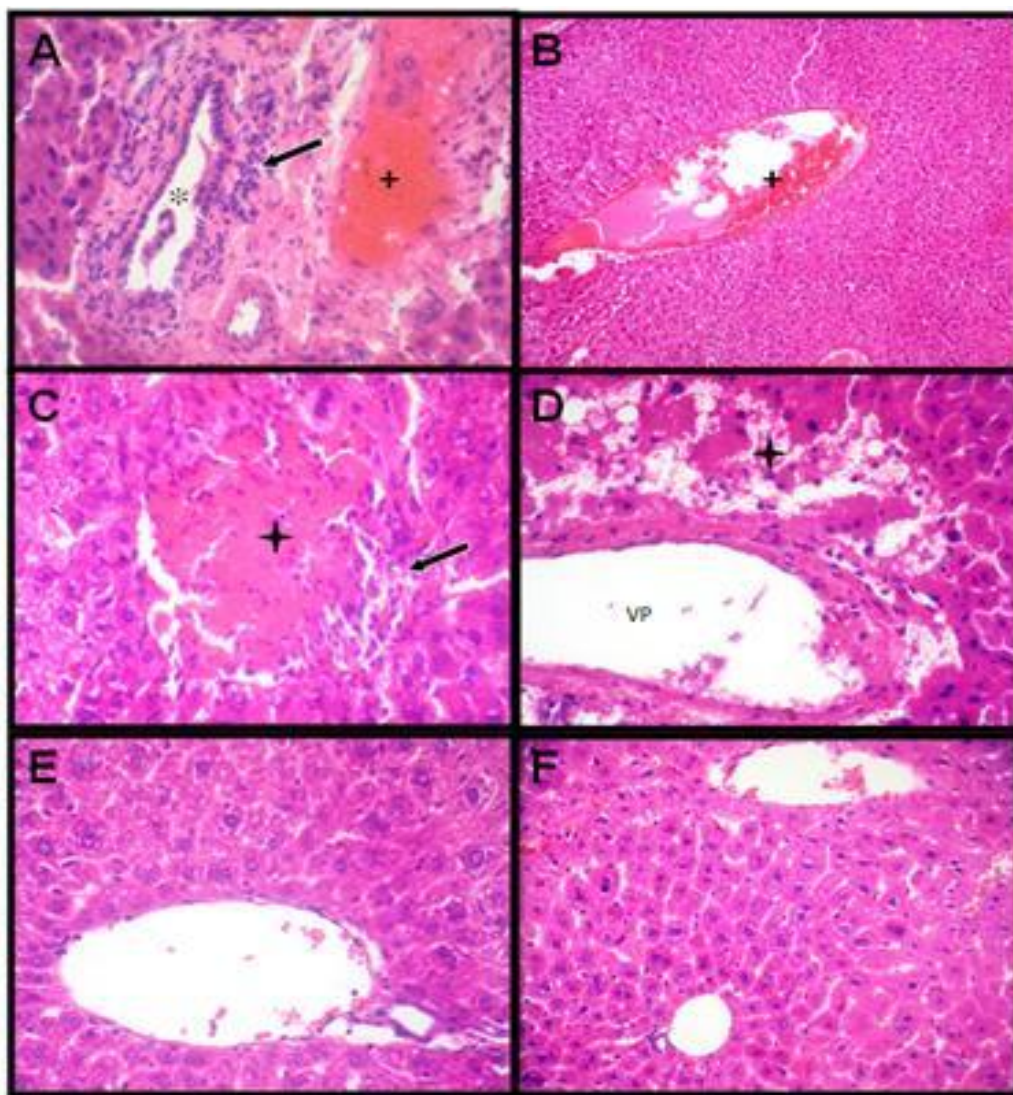


Figura 2: Fígado de ratinhos do grupo 1 (controlo negativo), HE. A - Veia central (VC) e veia porta (VP), 100x. B - Cordões de hepatócitos e veia central (VC), 400x, C - Veia porta (VC) e ductos biliares (\*), 400x.

Nos grupos em que foi administrado EE de *S. perennis* subsp. *perennis* (grupos 3 e 4), no geral, o fígado dos ratinhos evidenciou uma morfologia praticamente normal, quando comparado com o dos controlos negativos (Figs. 3E e 3F). No entanto, as veias hepáticas apresentaram-se congestionadas na maioria dos casos (Figs. 3A e 3B) e com áreas de infiltrado inflamatório (Figs. 3<sup>a</sup> e 3C). De salientar também que nos grupos 3 e 4, o fígado de um dos ratinhos



apresentou necrose de hepatócitos (Figs. 3C e 3D). Não se observaram diferenças significativas, em relação às alterações encontradas, entre os dois grupos. Estes resultados indicam um possível efeito hepatotóxico do EE.



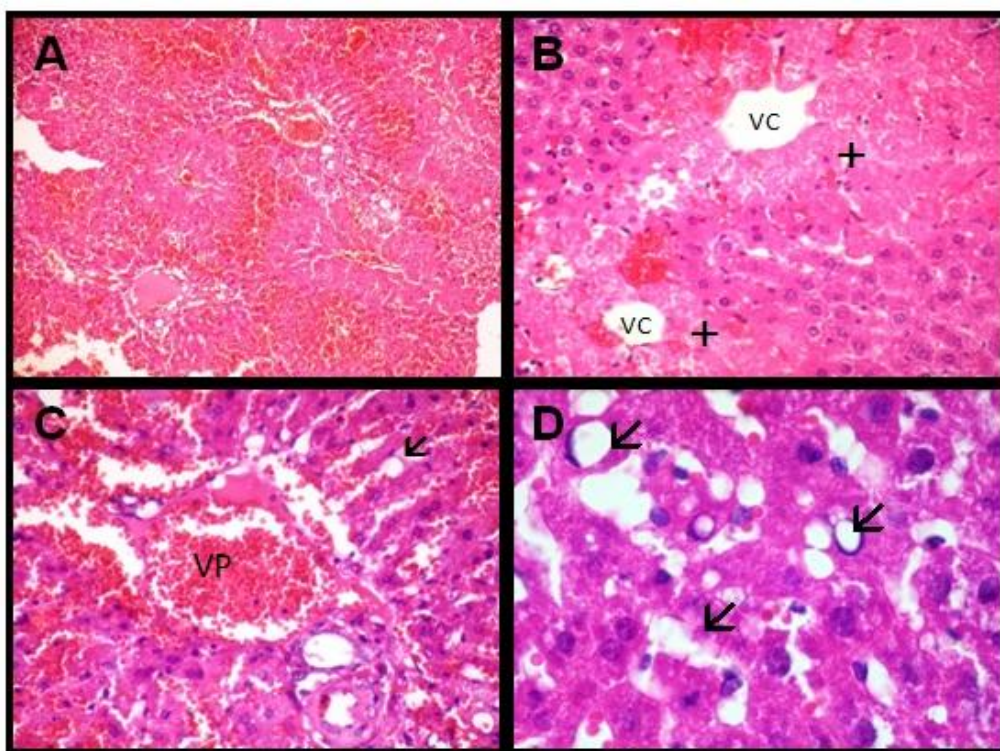
**Figura 3:** Fígado de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia), HE. A – grupo 3: congestão da veia porta (+) e inflamação (seta preta) do epitélio do ducto biliar (\*), 400x. B – grupo 4: congestão de veia hepática (+), 100x. C – grupo 3: necrose zonal de hepatócitos (+) e infiltrado inflamatório (seta preta), 400x. D – grupo 4: necrose de hepatócitos em redor da veia porta (VP), 400x. E (grupo 3) e F (grupo 4): parênquima hepático normal, 400x.

Todos os ratinhos do grupo 2 (controle positivo) apresentaram necrose centrolobular, a qual se estendia, na maioria dos casos, a mais de metade da



largura dos lóbulos hepáticos (Figs. 4A e 4B), acompanhada por esteatose macrovesicular nos hepatócitos remanescentes (Figs. 4C e 4D).

Observaram-se ainda algumas áreas de tumefação hidrópica, localizada aleatoriamente, extensas hemorragias (Figs. 4A e 4C), veias hepáticas congestionadas (Figs. 4A e 4C) e leves focos de inflamação. O tipo de lesões encontradas nos ratinhos expostos a CCl<sub>4</sub> está de acordo com o descrito na literatura (Haschek e Rousseaux, 1998; Rubin, 2006; Pandey *et al*, 2011).

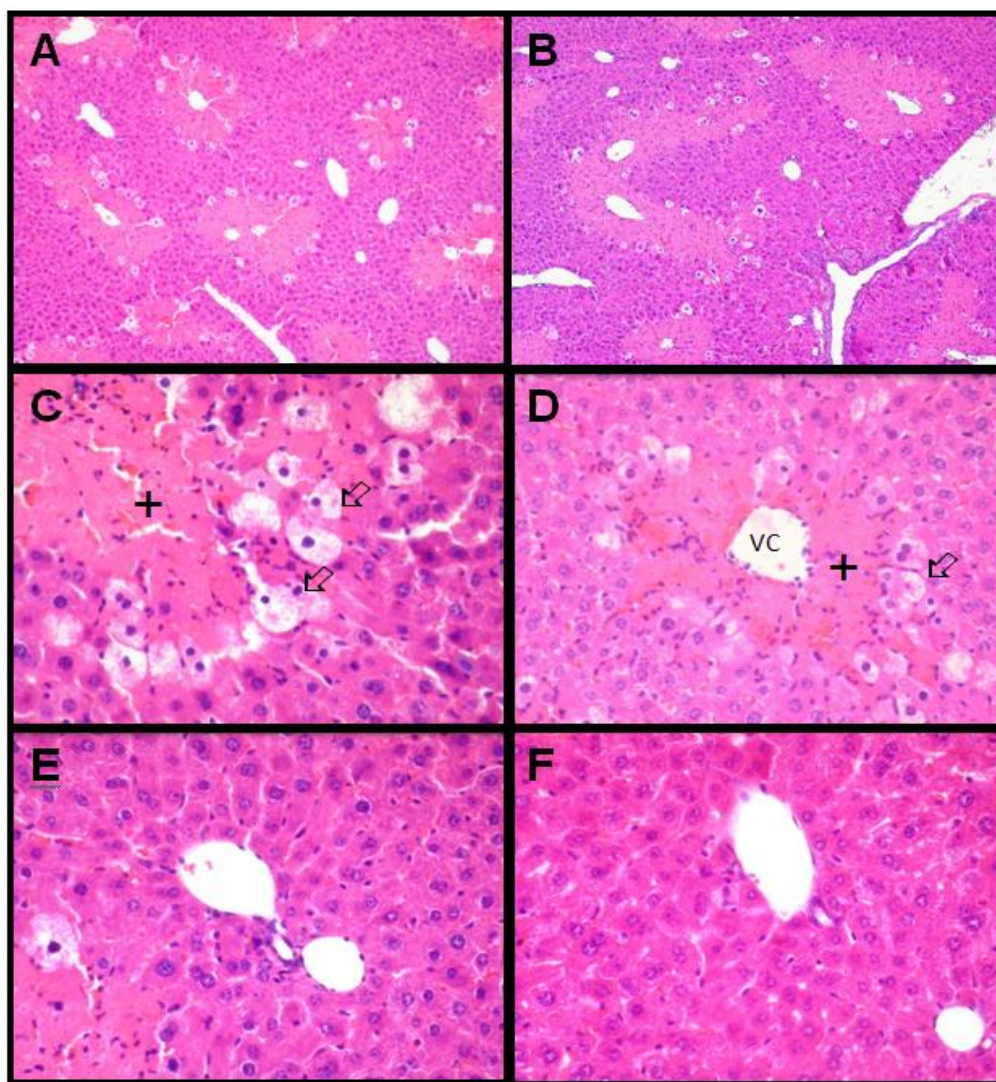


**Figura 4: Fígado de ratinhos do grupo 2 (controle positivo), HE. A – Necrose centrolobular e hemorragias, 40x. B – Necrose centrolobular (+), Veia central (VC), 400x. C – Veia porta (VP) congestionada, hemorragias e esteatose (→), 400x. D – Esteatose (→), 400x.**

Estas lesões provocam insuficiência hepática. A quantidade de hepatócitos funcionais é insuficiente para manter as atividades metabólicas, de desintoxicação e síntese, vitais, do fígado (Rubin, 2006).

As alterações induzidas no fígado pelo CCl<sub>4</sub>, nos ratinhos pré-tratados com EE (grupos 5 e 6), foram menos intensas do que as do grupo 2. A extensão da necrose centrolobular foi menor nos ratinhos destes grupos (Figs. 5A e 5B). A esteatose macrovesicular apresentou-se muito menos evidente, com vacúolos em

menor quantidade e dimensão, e em certos casos praticamente ausentes. Os hepatotóxicos provocam esteatose, devido principalmente à acumulação de triglicéridos (Rubin, 2006). O EE reverteu significativamente a esteatose induzida pelo CCl<sub>4</sub> indicando proteção e efeito terapêutico do “fígado gordo”.



**Figura 5:** Fígado de ratinhos dos grupos pré-tratados com EE (grupo 5: 0,5 mg/mL/dia e grupo 6: 2,0 mg/mL/dia) e CCl<sub>4</sub>, na dose de 0,5ml/Kg, 24 horas antes do sacrifício, HE. A (grupo 5) e B (grupo 6): necrose centrolobular e células em tumefação hidrópica a circundá-la, 40x. C (grupo 5) e D (grupo 6): necrose centrolobular (+) e células em tumefação hidrópica (⇨), 400x. E (grupo 5) e F (grupo 6): parênquima hepático, entre áreas de necrose, com especto normal, 400x.

Foram observadas várias células em tumefação hidrópica nos ratinhos pré-tratados, em que estas apareciam maioritariamente nos hepatócitos adjacentes à

necrose centrolobular (Figs. 5A - 5D). Contudo, desconhece-se a razão deste facto. A tumefação hidrópica é uma acumulação de água na matriz citosólica do retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos (Haschek e Rousseaux *et al*, 1998). É uma lesão celular aguda reversível. Esta pode ser causada não só por tóxicos, mas também por outras etiologias, como por exemplo o frio ou o calor excessivos (Rubin, 2006). Sendo uma lesão menos nociva que a necrose e a esteatose, a observação de mais áreas de tumefação hidrópica pode estar correlacionada com os efeitos protetores do EE. O fígado dos ratinhos dos grupos 5 e 6 apresentou ainda leves infiltrados inflamatórios e congestão das veias hepáticas. Observou-se também maior extensão de parênquima hepático livre de alterações histológicas em relação aos controlos positivos (Figs. 5E e 5F). Não se observaram diferenças significativas na quantidade de lesões entre os dois grupos.

A eficiência de uma droga protetora depende essencialmente da sua capacidade de reduzir os efeitos nocivos de um tóxico. A nível histológico essa eficiência pode ser verificada pela preservação da morfologia dos órgãos. Os resultados deste estudo sugerem que o EE em ambas as doses, protegeu o fígado contra os efeitos do CCl<sub>4</sub>.

A Tabela 5 apresenta os resultados da análise semi-quantitativa das lesões histológicas no fígado.

**Tabela 5: Análise semi-quantitativa das lesões histológicas no fígado**

	Lesões					
	Necrose Centrolobular (NC)	Esteatose Macrovesicular (EM)	Tumefação hidrópica (TH)	Congestão das veias hepáticas (C)	Hemorragias (H)	Leve Inflamação (I)
Grupo 2	++	++	A	X	++	X
Grupo 3	-	-	-	X	-	X
Grupo 4	-	-	-	X	-	X
Grupo 5	+	+	C	X	+	X
Grupo 6	+	+	C	X	+	X
Notas	Grupo 3: um ratinho apresentou necrose zonal Grupo 4: um ratinho apresentou necrose junto à veia porta					

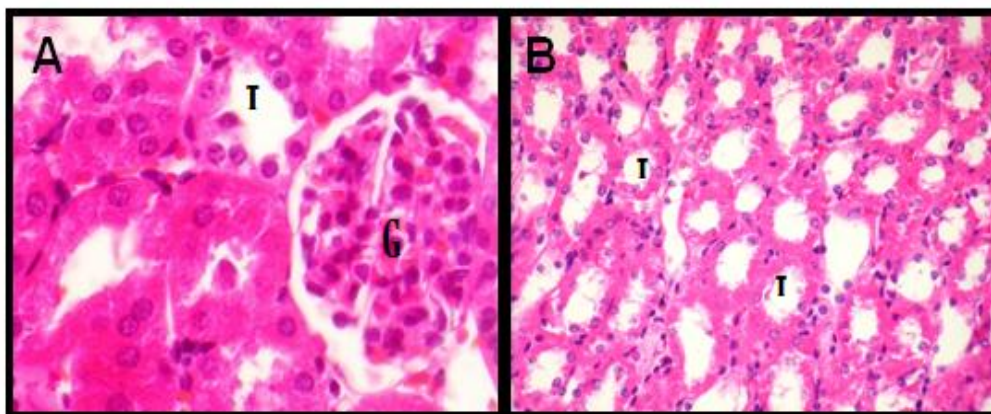


**NC:** (+) estende-se até metade da largura dos lóbulos hepáticos; (++) estende-se a mais de metade da largura dos lóbulos hepáticos; **EM:** (+) vacúolos pequenos e em menor quantidade; (++) vacúolos grandes e em maior quantidade; **TH:** (A) localiza-se aleatoriamente; (C) circunda as áreas de necrose centrolobular; **C:** (x) presente (-) ausente; **H:** (+) consideráveis; (++) extensas; **I:** (x) presente (-) ausente.

(-) Ausência

### III.6. Análise histológica do rim

Os ratinhos do grupo 1 apresentaram um parênquima renal normal, com os túbulos renais e glomérulos com morfologia típica (Fig. 6).

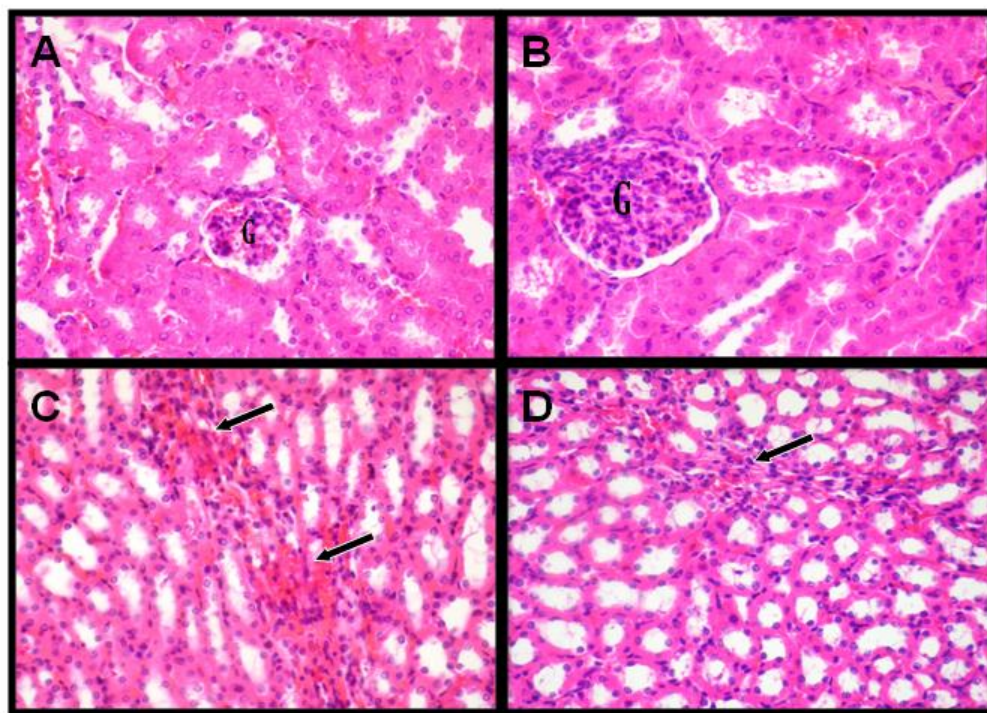


**Figura 6: Rim de ratinho do grupo 1 (controle negativo), HE. A -Túbulos renais (T) e glomérulo renal (G) na zona cortical, 400x. B – Túbulos renais na zona medular (T), 400x**

Nos grupos em que foi administrado EE (grupos 3 e 4), todos os ratinhos apresentaram uma morfologia normal do parênquima renal, quando comparados com os controles negativos (Fig. 7A). Contudo, verificaram-se leves infiltrados inflamatórios e hemorragias em ambos os grupos (Figs. 7B -7D).

Já tinha sido descrito anteriormente que os ratinhos destes grupos apresentaram alterações histológicas no fígado, nomeadamente a necrose de hepatócitos. Apesar das alterações observadas ao nível do rim terem apresentado menor gravidade, sugerem um potencial efeito nefrotóxico do EE administrado. Várias plantas medicinais podem apresentar efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos. A sobredosagem e a duração do tratamento representam algumas das causas

(Xie, 2011). Portanto, as doses utilizadas neste trabalho assim como a duração da experiência poderão ter levado ao aparecimento de alterações histológicas no rim e fígado dos ratinhos destes grupos.

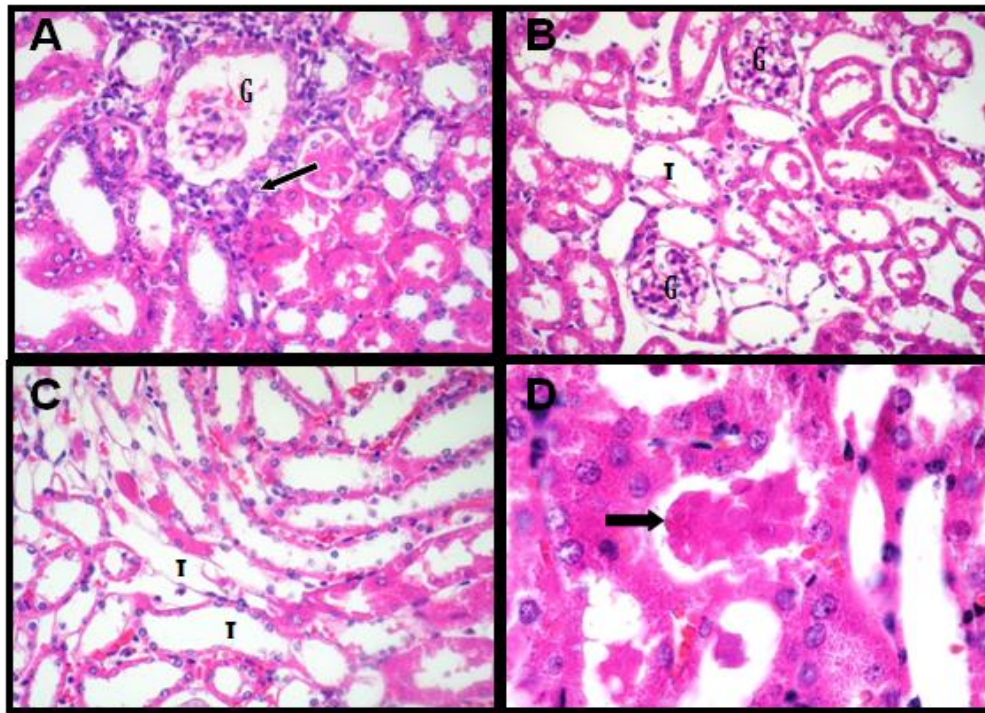


**Figura 7: Rim de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia), HE, 400x. A – grupo 3: parênquima normal, glomérulo (G). B – grupo 4: glomérulo (G) ligeiramente aumentado e com leve infiltrado inflamatório. C (grupo 3): infiltrado inflamatório e hemorragia (setas); D (grupo 4): infiltrado inflamatório (seta).**

No presente trabalho o fígado de todos os ratinhos do grupo 2 (controle positivo) apresentou necrose tubular (Fig. 8B). Ao nível dos glomérulos, observou-se atrofia glomerular e aumento do espaço de Bowman (Fig. 8A). Observaram-se também, em algumas zonas, infiltrados inflamatórios (Fig. 8A), dilatação dos túbulos renais (Fig. 8C) e corpos hialinos, provavelmente fragmentos celulares, nos túbulos renais (Fig. 8D). As lesões renais causadas pelo  $\text{CCl}_4$  são consistentes com o descrito na literatura (Haschek e Rousseaux, 1998; Rubin, 2006).

A necrose tubular aguda induzida pelo  $\text{CCl}_4$  resulta em taxa reduzida de filtração glomerular e disfunção epitelial tubular. Esta envolve vasoconstrição intra-renal, alteração do tónus arteriolar por *feedback* tubuloglomerular, pressão

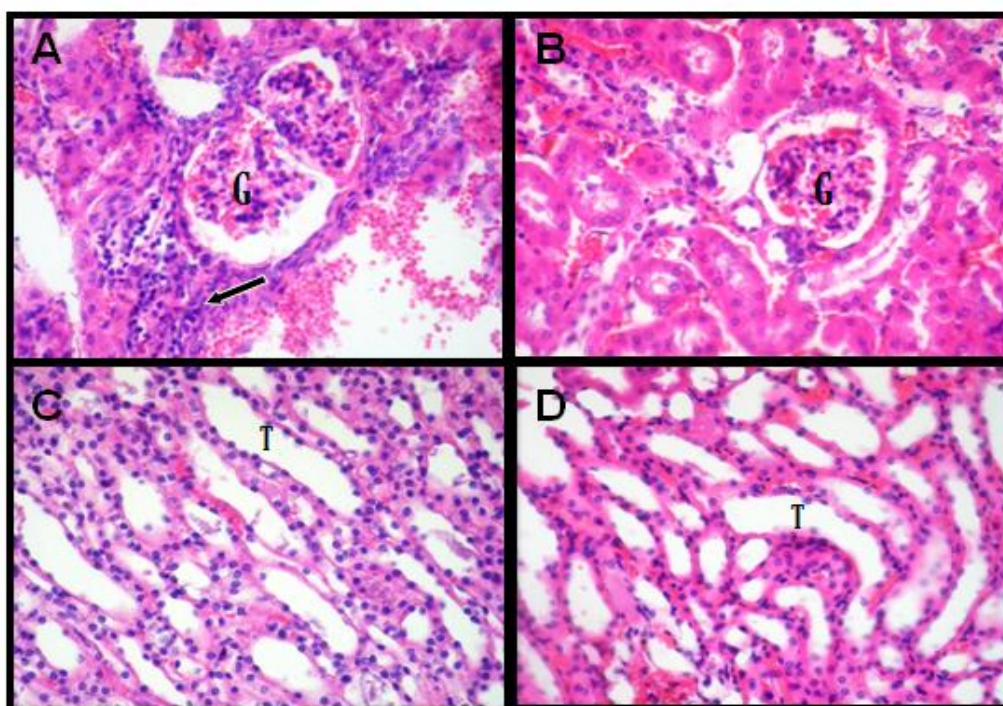
hidrostática glomerular diminuída, permeabilidade capilar glomerular diminuída, obstrução tubular por fragmentos celulares e extravasamento retrógrado de filtrado glomerular para o interstício através do epitélio tubular lesado. (Rubin *et al*, 2006)



**Figura 8: Rim de ratinho do grupo 2 (controle positivo), HE. A – Glomérulo (G) atrofiado e aumento do espaço de Bowman, infiltrado inflamatório (seta preta), 400x. B – Necrose dos túbulos (T), 400x. C – Dilatação dos túbulos renais (T), 400x. D – massa hialina no interior do túbulo renal (seta a negro), 1000x.**

As alterações provocadas no rim pelo CCl<sub>4</sub>, nos ratinhos pré-tratados com EE (grupos 5 e 6), foram semelhantes às do grupo 2. Contudo, observou-se menor grau de atrofia glomerular. Observaram-se outras alterações glomerulares (Figs. 9A e 9B), necrose tubular, alguns infiltrados inflamatórios (Fig. 9A) dilatação dos túbulos renais (Figs. 9C e 9D) e massas hialinas nos túbulos renais. Não se observaram diferenças significativas na extensão de lesões entre os dois grupos.





**Figura 9:** Rim de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia) e  $\text{CCl}_4$ , na dose de 0,5ml/Kg, 24 horas antes do sacrifício, HE, 400x. A – grupo 3: glomérulo (G) aumentado e desorganizado, infiltrado inflamatório (seta preta) e hemorragias. B – grupo 4: glomérulo (G) desorganizado. C (grupo 3) e D (grupo 4): Túbulos (T) dilatados.

Os resultados da análise semi-quantitativa das lesões histológicas no rim estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6: Análise semi-quantitativa das alterações histológicas no rim**

	Lesões				
	Necrose tubular (NT)	Alteração Glomerular (AG)	Dilatação dos túbulos (DT)	Infiltrados inflamatórios (I)	Hemorragias (H)
<b>Grupo 2</b>	X	X, A	X	X	++
<b>Grupo 3</b>	-	-	-	X	+
<b>Grupo 4</b>	-	-	-	X	+
<b>Grupo 5</b>	X	X	X	X	++
<b>Grupo 6</b>	X	X	X	X	++

**NT:** (x) presente (-) ausente; **AG:** (x) presente (-) ausente (A) atrofia glomerular é mais prevalente; **DT:** (x) presente (-) ausente; **I:** (x) presente (-) ausente; **H:** (+) consideráveis (++) extensas

Como já foi referido anteriormente, o tratamento com EE, em ambas as doses (grupos 5 e 6), diminuiu significativamente o peso dos rins. Apesar de,

microscopicamente, não se terem observado melhorias significativas na morfologia dos rins em animais expostos ao  $\text{CCl}_4$ , o EE apresentou um efeito nefroprotetor, reduzindo o peso do rim nesses ratinhos.

### III.7. Análise histológica do baço

Os ratinhos do grupo 1 (controlo negativo) apresentaram um parênquima esplênico normal, evidenciando a polpa vermelha distinta da polpa branca, a cápsula de tecido conjuntivo denso e trabéculas com morfologia típica e presença de macrófagos (Fig. 10).

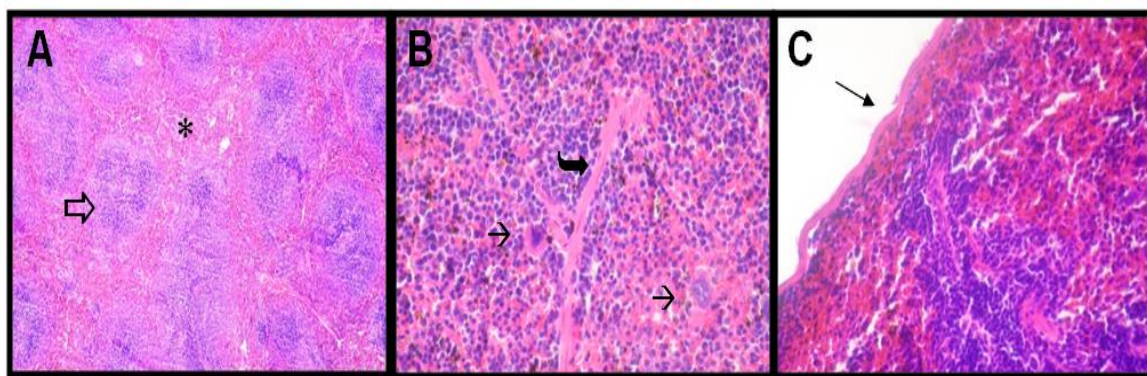


Figura 10: Baço de ratinhos do grupo 1 (controlo negativo), HE. A – Polpa vermelha (\*) e polpa branca (⇨), 40x. B – Trabécula de tecido conjuntivo (↵), macrófagos (→), 400x. C – Cápsula de tecido conjuntivo (seta a negro); 400x

Nos grupos 3 e 4, em que foi administrado EE, o parênquima esplênico dos ratinhos evidenciou uma estrutura normal (Fig. 11).



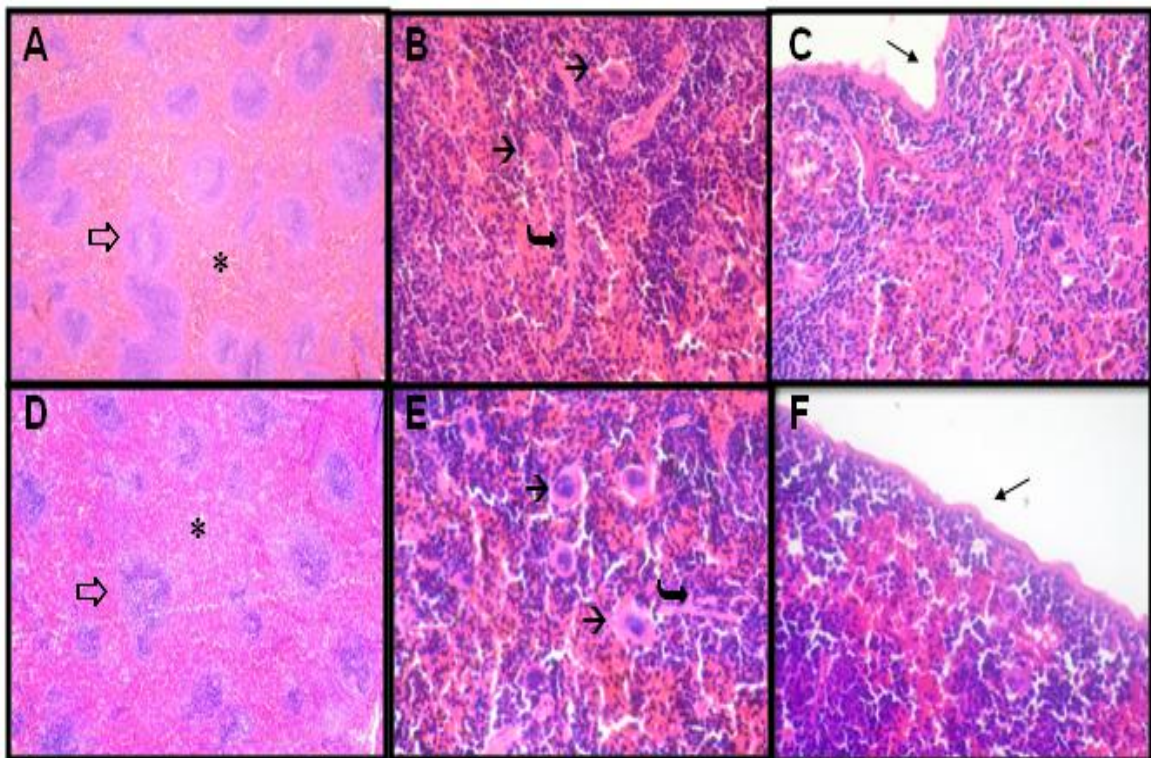
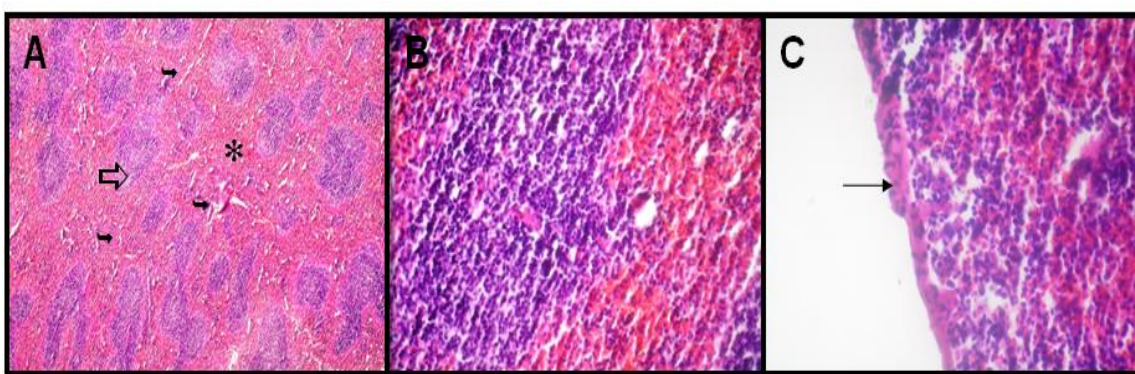


Figura 11: Baço de ratinhos dos grupos administrados com EE de *S. perennis* subsp. *Perennis* (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia), HE. A (grupo 3) e D (grupo 4): Polpa vermelha (\*) e polpa branca (⇨), 40x. B (grupo 3) e E (grupo 4): Trabécula de tecido conjuntivo (↵), macrófagos (→), 400x. C (grupo 3) e F (grupo 4): Cápsula de tecido conjuntivo (seta preta), 400x

Os ratinhos do grupo 2 (controle positivo) apresentaram alguma dilatação dos seios esplênicos (Figura 12A), infiltrados inflamatórios na cápsula (Figura 12C) e ausência de trabéculas de tecido conjuntivo e macrófagos no parênquima esplênico (Figura 12B). Num artigo de revisão sobre lesões histológicas causadas por tóxicos, foi descrita a inflamação da cápsula do baço e a dilatação dos seios esplênicos como possíveis alterações observadas (Nishikawa *et al*, 2010). A observação dos seios esplênicos dilatados pode estar relacionada com a extensão das lesões hepáticas induzidas pelo CCl<sub>4</sub> nos ratinhos deste grupo. Essas lesões poderão ter resultado em hipertensão porta pela obstrução ao fluxo sanguíneo em algum lugar do circuito porta. Com origem na junção da veia mesentérica superior com a veia esplênica, a veia porta é responsável pela drenagem venosa oriunda do baço para o fígado. Uma das consequências da hipertensão porta é a dilatação dos seios esplênicos (Rubin, 2006).

Entretanto, existem evidências que alguns xenobióticos causam imunossupressão (Roberts e Adams, 2000) o que poderá explicar a ausência de macrófagos no baço dos ratinhos. Contudo, a presença de infiltrado inflamatório na cápsula indica que houve recrutamento de células inflamatórias, nomeadamente leucócitos polimorfonucleares, que na inflamação aguda migram dos vasos sanguíneos para o tecido circundante, a fim de combater o agente agressor (Rubin, 2006). Assim, sugere-se que o  $\text{CCl}_4$  possa afetar particularmente a atividade dos macrófagos.



**Figura 12:** Baço de ratinhos do grupo 2 (controlo positivo), HE. A – polpa branca (⇒), polpa vermelha (\*), dilatação dos seios (↯); 40x. B – Ausência de trabéculas de tecido conjuntivo e macrófagos, 400x. C – Infiltrado inflamatório na cápsula (seta preta), 400x.

As alterações induzidas no baço pelo  $\text{CCl}_4$ , nos ratinhos pré-tratados com EE (grupos 5 e 6), foram claramente inferiores às do grupo 2. Nestes grupos, não se observou inflamação da cápsula em nenhum animal (Figs. 13 C e 13 F). Para além disso, verificou-se uma quantidade normal de macrófagos e trabéculas (Figs. 13 B – 13E). Os seios esplénicos apresentaram-se normais, assim como toda a morfologia do baço (Figuras 13 A e 13 D). Aparentemente, o baço dos ratinhos deste grupo apresentou uma morfologia semelhante ao do controlo negativo.



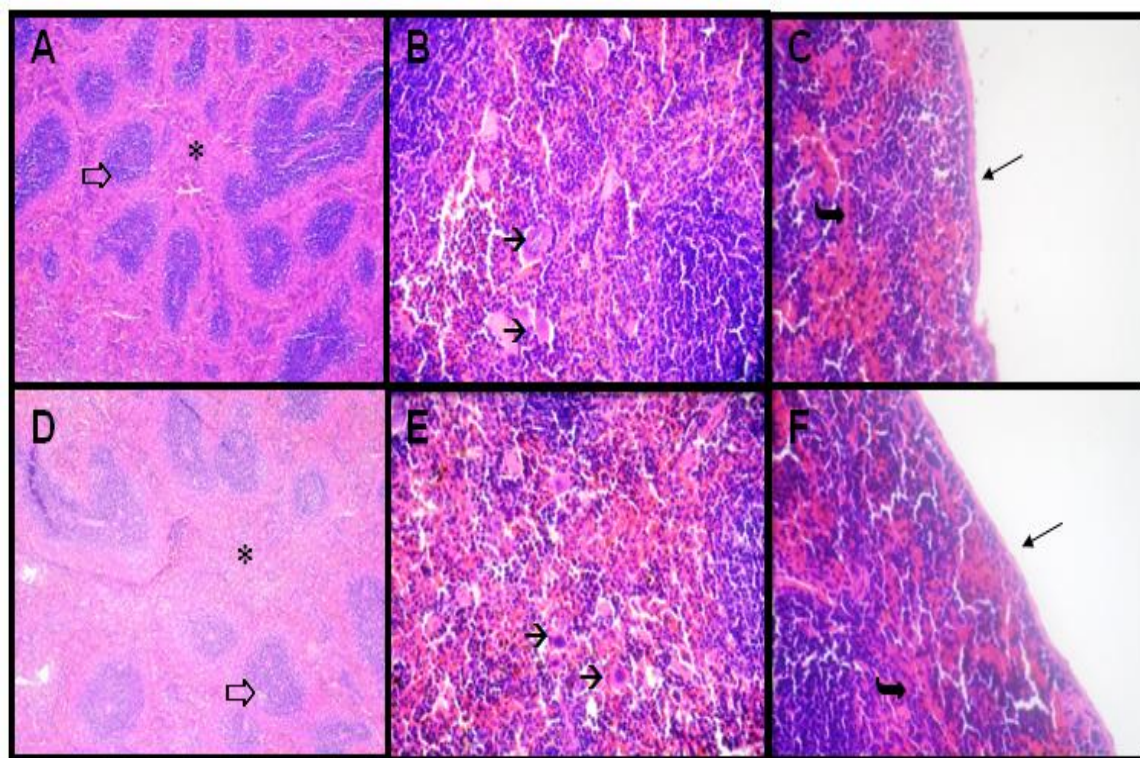


Figura 13: Baço de ratinhos dos grupos pré-tratados com EE de *S. perennis* subsp. *perennis* (grupo 5: 0,5 mg/mL/dia e grupo 6: 2,0 mg/mL/dia) e CCl<sub>4</sub> na dose de 0,5ml/Kg, 24 horas antes do sacrifício, HE. A (grupo 3) e D (grupo 4): polpa vermelha (\*) e polpa branca (⇨), 40x. B (grupo 3) e E (grupo 4): macrófagos (→), 400x. C (grupo 3) e F (grupo 4): cápsula de tecido conjuntivo (seta preta) e trabécula de tecido conjuntivo (↗), 400x.

A Tabela 7 apresenta os resultados da análise semi-quantitativa das alterações histológicas no baço.

Tabela 7: Análise semi-quantitativa das alterações histológicas no baço

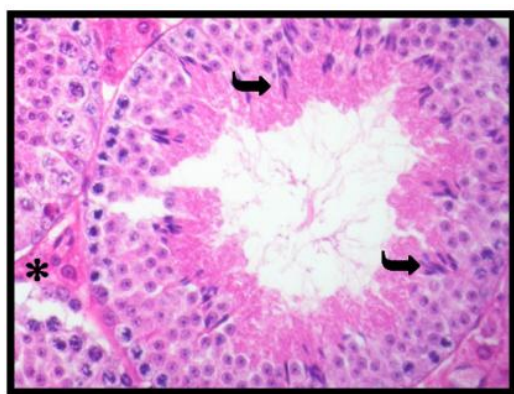
	Lesões			
	Infiltrado inflamatório na cápsula (IC)	Seios esplênicos dilatados (SD)	Macrófagos (M)	Trabéculas (T)
Grupo 2	X	X	-	-
Grupo 3	-	-	X	X
Grupo 4	-	-	X	X
Grupo 5	-	-	X	X
Grupo 6	-	-	X	X

IC: (x) presente (-) ausente; SD: (+) presentes (-) ausentes; M: (x) presentes (-) ausentes; T: (+) presentes (-) ausentes.

O EE, em ambas as doses, teve efeitos protetores ao nível do baço, relativamente aos efeitos nocivos do tóxico. Num outro estudo, extratos de *Pterospartum tridentatum*, demonstraram efeitos protetores do baço contra os efeitos do CCl<sub>4</sub> (Silva, 2009). Por ter contribuído para a normalização do número de macrófagos sugere-se ainda que possa atuar beneficemente ao nível do sistema imunitário. Há referência ao efeito imunoestimulador em ratinhos imunossuprimidos após administração de extratos de plantas (Bafna e Mishra, 2006).

### III.8. Análise histológica do testículo

Os ratinhos do grupo 1 (controlo negativo) apresentaram os túbulos seminíferos com morfologia normal e os seus componentes celulares perfeitamente organizados (Fig. 14).

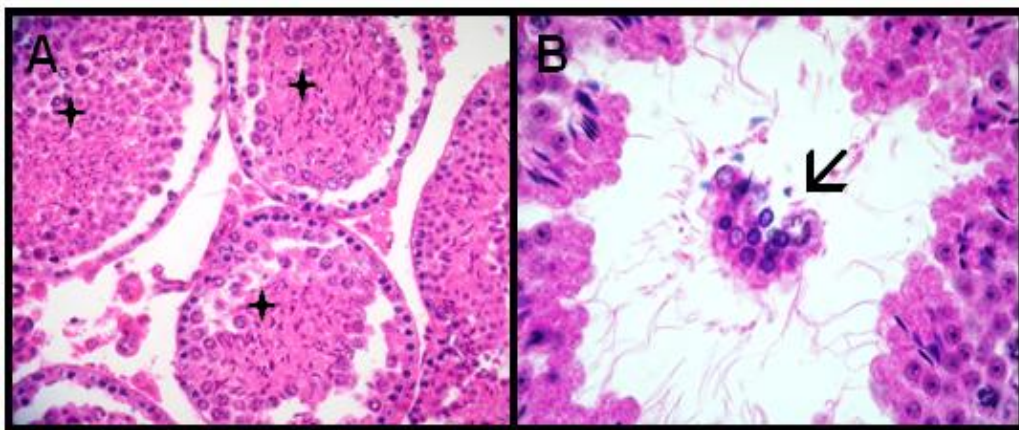


**Figura 14:** Testículo de ratinho do grupo 1 (controlo negativo), HE: Túbulo seminífero com morfologia normal, espaço intersticial (\*), espermátides (↞), 400x.

Nos grupos em que foi administrado EE (grupos 3 e 4), constatarem-se alterações significativas nos testículos, não se observando diferenças entre os dois grupos. Apesar de também terem sido descritas algumas alterações no fígado e rins, foi ao nível do sistema reprodutor masculino que as alterações se apresentaram mais evidentes e consistentes. Neste trabalho observou-se desorganização dos componentes celulares dos túbulos seminíferos (Fig. 15A), assim como células imaturas no lúmen (Fig. 15B). Alguns túbulos apresentaram ainda vacúolos e células em degenerescência. Contudo, as alterações foram

heterogêneas, observando-se simultaneamente áreas morfologicamente normais em cada corte.

Alguns estudos no âmbito terapêutico ou de contraceção demonstraram o efeito tóxico de várias plantas no sistema reprodutor masculino, apesar de algumas terem demonstrado efeitos benéficos em várias doenças (D'Cruz *et al*, 2010). Vários autores relatam os efeitos histopatológicos de plantas, ou compostos delas extraídas, nos testículos. A piperina, um alcalóide extraído de frutas e raízes da pimenta preta, causou danos nas células germinativas quando administrado oralmente a ratos durante 30 dias (Malini *et al*, 1999). O extrato de *Abrus precatorious* fornecido nas doses de 400mg, 800mg e 1600 mg por kg de peso corporal, durante 18 dias, causou degenerescência testicular, caracterizada por uma redução de células no epitélio (Adedapo *et al*, 2007). Há ainda estudos que relatam a reversibilidade das lesões. O extrato de rizoma de *Curcuma longa*, na dose de 600mg/kg de peso corporal por 56 e 84 dias, causaram perda do epitélio germinativo, vacuolização e uma desorganização de espermatídes em diferentes fases da espermatogénese nos túbulos seminíferos, sendo estes efeitos reversíveis após 56 dias (Mishra *et al*, 2009).



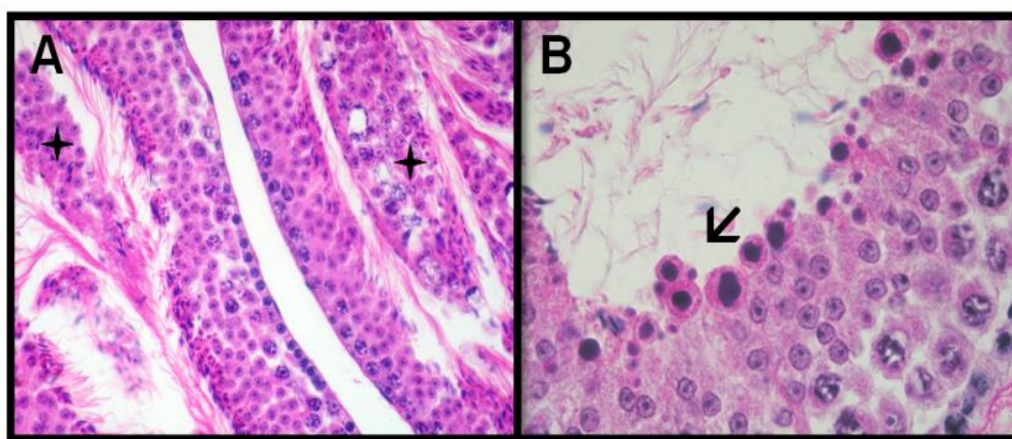
**Figura 15: Testículo de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia), HE. A – grupo 3: túbulos seminíferos desorganizados (+), 400x. B – túbulo seminífero com células imaturas em degenerescência no lúmen (→), 1000x.**

Neste trabalho, tal como nos grupos 3 e 4, todos os ratinhos do grupo 2 (controlo positivo) apresentaram túbulos com células imaturas nos lúmens (Fig. 16A) e presença de células em degenerescência (Fig. 16B). Neste grupo



observou-se maior quantidade de túbulos desorganizados e vacuolizados, quando comparados com os grupos 3 e 4. As alterações encontradas foram também heterogêneas.

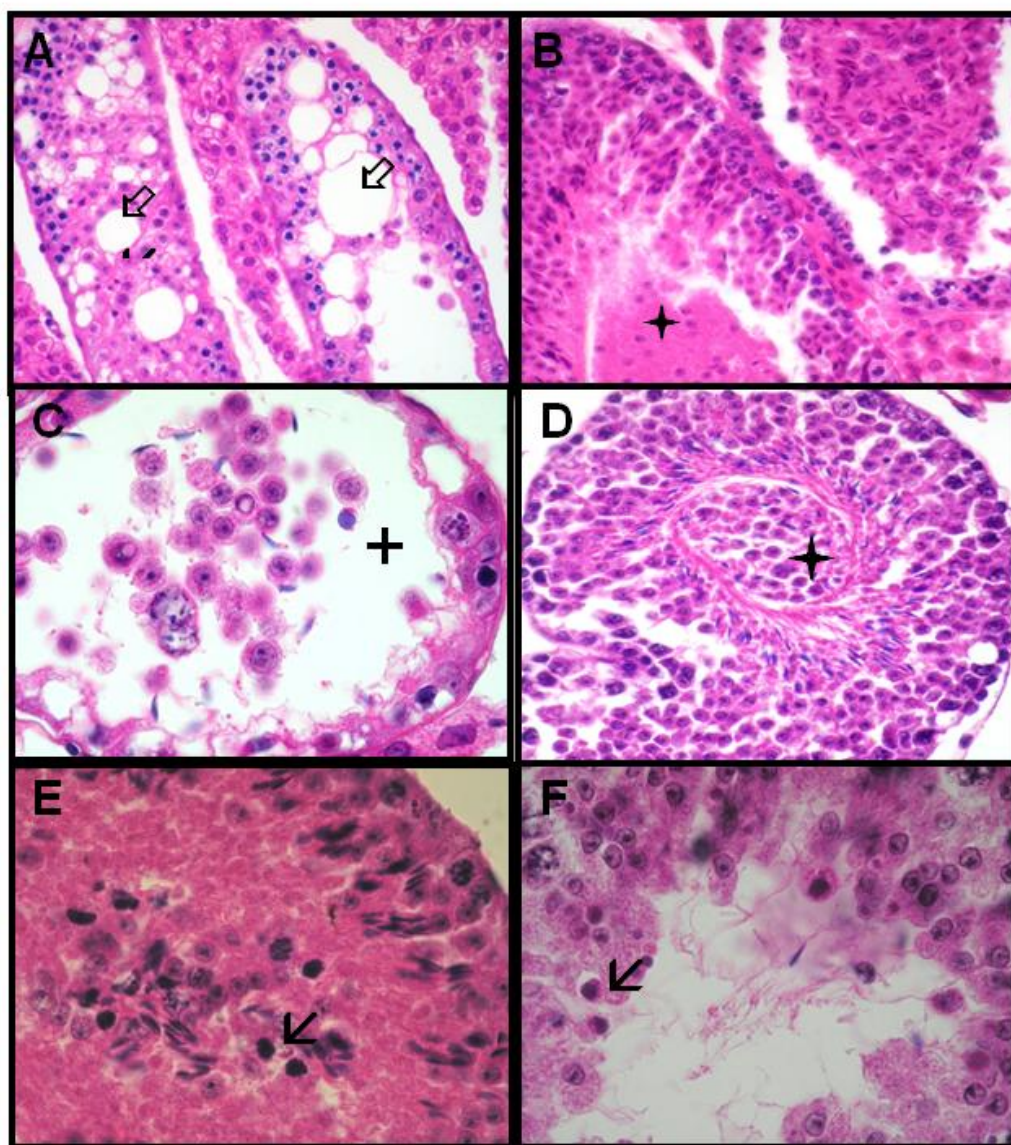
No presente trabalho, o tipo de lesões observadas nos testículos de ratinhos expostos ao  $\text{CCl}_4$  são semelhantes aos de trabalhos anteriores realizados na Universidade de Aveiro (Oliveira, 2009; Rodrigues *et al*, 2011).



**Figura 16: Testículo de ratinhos do grupo 2 (controle positivo), HE. A – túbulos seminíferos desorganizados com células imaturas nos lúmens (+), 400x. B – túbulo seminífero com células em degenerescência (→), 1000x.**

As alterações induzidas no testículo pelo  $\text{CCl}_4$ , nos ratinhos pré-tratados com EE (grupos 5 e 6), foram mais intensas do que as dos restantes grupos. Observaram-se maior número de vacúolos e de maiores dimensões (Fig. 17A), maior quantidade de túbulos desorganizados (Figs. 17A-17D), com células em degenerescência (Figs. 17E e 17F) e imaturas no lúmen (Figs. 17B-17D). Estes resultados sugerem que o tóxico e o EE de *S. perennis* subsp. *perennis* tiveram um efeito sinérgico ao nível dos testículos.

Os ratinhos do grupo 5 apresentaram lesões mais intensas do que os do grupo 6, verificando-se, para além das lesões já descritas, degenerescência tubular, caracterizada por uma redução de células no epitélio (Fig. 17C). Já foi descrito anteriormente que o EE teve efeitos protetores, principalmente ao nível do fígado e baço e em simultâneo, provocou algumas alterações histológicas no fígado e rim. Provavelmente, na dose mais elevada, o EE manifestou os efeitos protetores contra o  $\text{CCl}_4$  e por isso foram encontradas menos lesões no grupo 6.



**Figura 17: Testículo de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia) e CCl<sub>4</sub> na dose de 0,5ml/Kg, 24 horas antes do sacrifício, HE. A – grupo 3: vacúolos (⇨), 400x; B - grupo 4: túbulo seminífero com células imaturas no lúmen (+), 400x; C – grupo 3: degenerescência tubular, 1000x. D – grupo 4: túbulo seminífero desorganizado e com células imaturas no lúmen (+), 400x; E (grupo 3) e F (grupo 4): túbulo com células em degenerescência (→), 1000x.**

A Tabela 8 apresenta os resultados da análise semi-quantitativa das alterações histológicas no testículo.

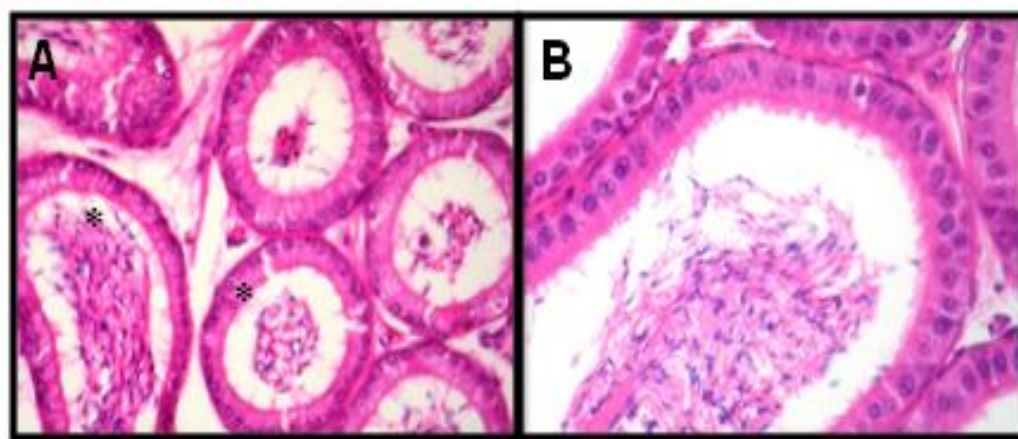
**Tabela 8: Análise semi-quantitativa das alterações histológicas no testículo**

	Lesões				
	Vacuolização dos túbulos seminíferos (V)	Células imaturas nos lúmens (CL)	Células em degenerescência (CD)	Desorganização dos túbulos (DT)	Degenerescência dos túbulos (D)
<b>Grupo 2</b>	++	+	+	++	-
<b>Grupo 3</b>	+	+	+	+	-
<b>Grupo 4</b>	+	+	+	+	-
<b>Grupo 5</b>	+++	++	++	+++	X
<b>Grupo 6</b>	++	++	++	+++	-

**V:** (+) leve (++) considerável (+++) extensa; **CL:** (+) menor quantidade de túbulos afetados; (++) maior quantidade túbulos afetados; **CD:** (+) menor quantidade; (++) maior quantidade; **DT:** (+) poucos túbulos afetados; (++) alguns túbulos afetados (+++) bastantes túbulos afetados; **D:** (x) presente (-) ausente

### III.9. Análise histológica do epidídimo

Os ratinhos do grupo 1 (controlo negativo) apresentaram os ductos epididimários com epitélio regular e repletos de espermatozóides no lúmen (Fig. 18).

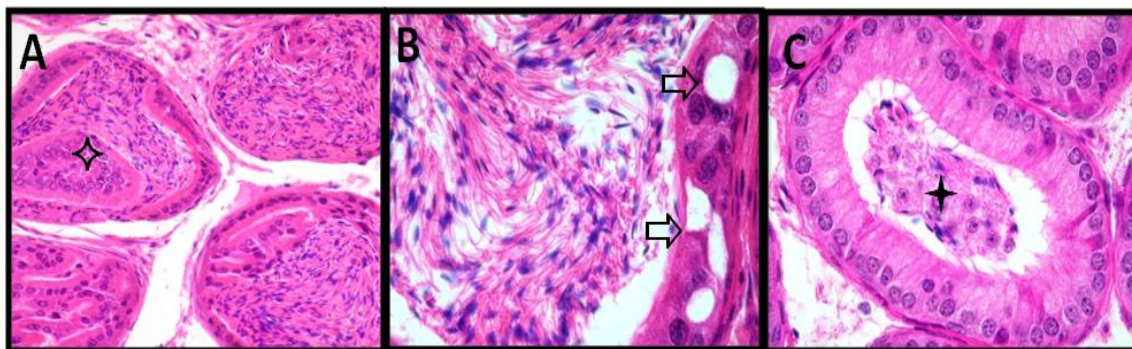


**Figura 18: Epidídimo de ratinhos do grupo 1 (controlo negativo), HE. A – Ductos epididimários com morfologia normal (\*) B - ducto epididimário com espermatozoides no lúmen, 1000x.**

Nos grupos em que foi administrado EE (grupos 3 e 4), os ratinhos apresentaram alterações no epidídimo, consistentes com as encontradas nos



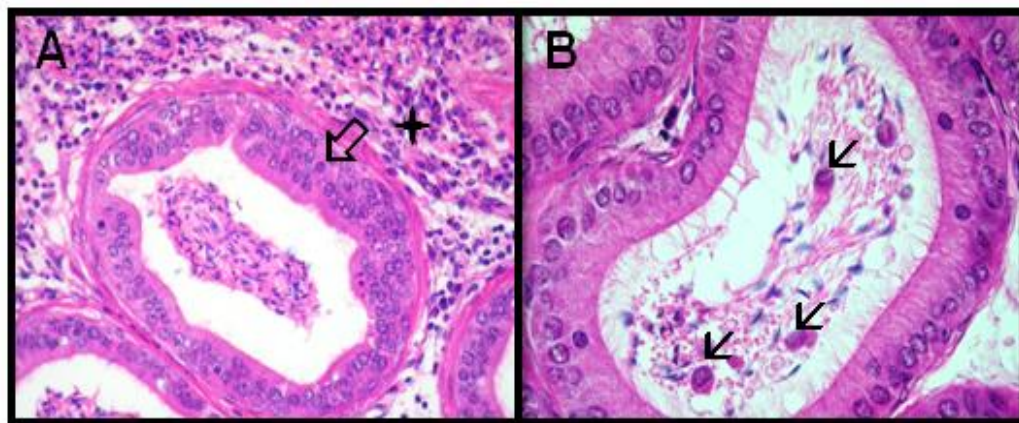
testículos. Observou-se alguma desorganização do epitélio dos ductos epididimários (Fig. 19A), assim como células imaturas no lúmen (Figs. 19A e 19C). Alguns ductos apresentaram ainda vacúolos (Fig. 19B). Tal como no testículo, as alterações encontradas foram heterogêneas. Não se observaram diferenças significativas na quantidade de alterações entre os dois grupos.



**Figura 19: Epidídimo de ratinhos dos grupos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia), HE. A – grupo 3: ductos epididimários desorganizados (◊), 400x. B – grupo 3: epitélio do ducto vacuolizado (⇒), 1000x. C – grupo 4: células imaturas no lúmen do ducto (+), 1000x.**

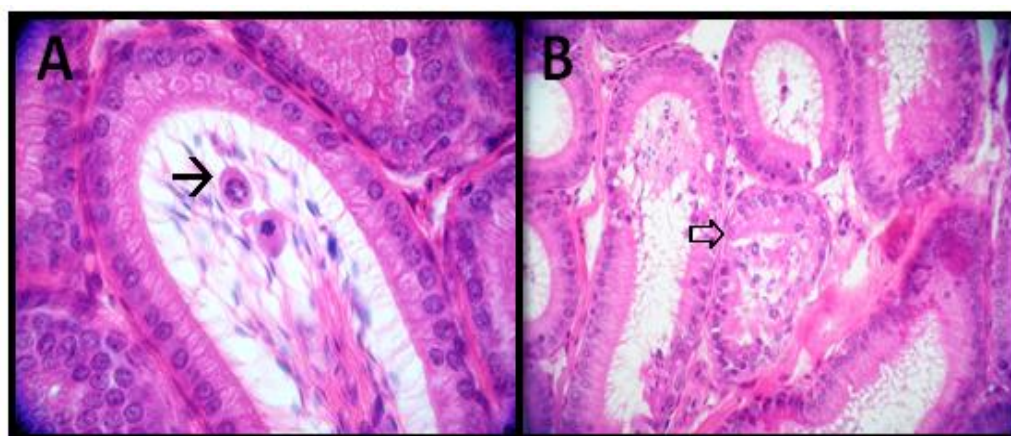
Tal como nos grupos 3 e 4, os ratinhos do grupo 2 apresentaram ductos com células imaturas no lúmen (Figs. 20A e 20B), desorganização do epitélio (Fig. 20A) e vacuolização. Em alguns casos observaram-se ainda infiltrados inflamatórios (Fig. 20A). As alterações encontradas também foram heterogêneas.

As lesões observadas no epidídimo de ratinhos expostos ao  $\text{CCl}_4$  foram semelhantes às verificadas em trabalhos anteriores realizados na Universidade de Aveiro (Oliveira, 2009; Rodrigues *et al*, 2011).



**Figura 20:** Epidídimo de ratinhos do grupo 2 (controle positivo), HE. A – ducto epididimário com epitélio desorganizado (⇒) e infiltrado inflamatório (+), 400x. B – ducto epididimário com células imaturas no lúmen (→), 1000x.

As alterações produzidas no epidídimo pelo  $\text{CCl}_4$ , nos ratinhos pré-tratados com EE de *S. perennis* subsp. *perennis* (grupos 5 e 6), foram idênticas aos restantes grupos. Constatou-se a ocorrência de ductos com epitélio desorganizado e com vacúolos (Fig. 21 B). Contudo, observaram-se mais ductos com células imaturas nos lúmens (Figs. 21A). Novamente as alterações foram heterogêneas e não se observaram diferenças significativas na quantidade de alterações entre os dois grupos, apesar de terem sido observadas diferenças entre os dois grupos ao nível do testículo.



**Figura 21:** Epidídimo de ratinhos administrados com EE (grupo 3: 0,5 mg/mL/dia e grupo 4: 2,0 mg/mL/dia) e  $\text{CCl}_4$  na dose de 0,5ml/Kg, 24 horas antes do sacrifício, HE. A – grupo 3: células imaturas nos lúmens (→), 1000x; B - grupo 4: ductos epididimários com epitélio desorganizado (⇒), 400x.

A Tabela 9 apresenta os resultados da análise semi-quantitativa das alterações histológicas no epidídimo.

**Tabela 9: Análise semi-quantitativa das alterações histológicas no epidídimo**

	<b>Lesões</b>		
	Vacuolização dos ductos epididimários (V)	Células imaturas nos lúmens (CL)	Desorganização do epitélio dos ductos epididimários (D)
<b>Grupo 2</b>	<b>X</b>	<b>+</b>	<b>X</b>
<b>Grupo 3</b>	<b>X</b>	<b>+</b>	<b>X</b>
<b>Grupo 4</b>	<b>X</b>	<b>+</b>	<b>X</b>
<b>Grupo 5</b>	<b>X</b>	<b>++</b>	<b>X</b>
<b>Grupo 6</b>	<b>X</b>	<b>++</b>	<b>X</b>

**V:** (x) presença (-) ausência; **CL:** (+) menor quantidade de túbulos afetados; (++) maior quantidade de túbulos afetados; **D:** (x) presença (-) ausência

### III.10. Avaliação da função hepática

O aumento dos níveis das enzimas ALT e AST em ratinhos administrados com CCl<sub>4</sub> indica danos nas células hepáticas (Wolf, 1999). Vários autores relataram que extratos de plantas diminuíram significativamente esses níveis, demonstrando hepatoproteção (Shahjahan *et al*, 2004; Aniya *et al*, 2005; Gao *et al*, 2011).

No presente trabalho não foi possível realizar testes estatísticos fiáveis para verificar se existiam diferenças significativas nos valores da AST e da ALT entre os diferentes grupos. Em alguns casos não se conseguiu colher sangue suficiente para análise e noutros observaram-se valores de enzimas próximos de zero ou negativos. Todos esses valores foram excluídos para o cálculo das médias. Mesmo assim, os desvios padrão observados foram bastante elevados (Tabela 10).

**Tabela 10: Efeitos do EE de *S. perennis* subsp. *perennis* em enzimas marcadoras de função hepática em ratinhos expostos ao CCl<sub>4</sub>**

		Enzimas			
		AST (U/L)	n	ALT (U/L)	n
Grupos	1	3565,6±1904,1	5	447,4±274,5	5
	2	6299±2861,0	3	2918±2626,2	2
	3	1599,2±839,2	5	777,0±618,2	5
	4	1561,4±762,7	5	215,4±56,5	5
	5	5958,3±1887,9	4	2448,7±2158,2	3
	6	5568,8±1221,8	5	3117,8±2126,2	4

**Grupo 1:** controlo negativo; **Grupo 2:** controlo positivo; **Grupo 3:** EE de *S. perennis* subsp. *perennis* 0,5 mg/ml/dia; **Grupo 4:** EE de *S. perennis* subsp. *perennis* 2,0 mg/ml/dia; **Grupo 5:** EE de *S. perennis* subsp. *perennis* 0,5 mg/ml/dia+CCl<sub>4</sub>; **Grupo 6:** EE de *S. perennis* subsp. *perennis* 2,0 mg/ml/dia+CCl<sub>4</sub>

A literatura consultada não permitiu o esclarecimento para a grande variabilidade de valores encontrados. Neste sentido, não é possível concluir sobre os efeitos do EE na função hepática de ratinhos expostos ao CCl<sub>4</sub>. Contudo, verifica-se que as médias dos níveis das enzimas dos ratinhos administrados com CCl<sub>4</sub> (2, 5 e 6) são mais elevadas que as dos restantes grupos (1, 3 e 4), como já era de esperar (Tabela 10).

Diversos trabalhos sobre hepatoproteção com plantas medicinais correlacionaram os resultados da análise histológica com os resultados bioquímicos, e em todos uma maior extensão de lesão celular correspondia a valores mais elevados das enzimas (Murugesan *et al.*, 2009; Azeem *et al.*, 2010). Neste trabalho, verificou-se que no grupo 2 (controlo positivo), os cortes histológicos que apresentaram maior extensão de necrose corresponderam a níveis de enzimas baixos, alguns dos quais abaixo do limite de deteção (<3 U/L) do método (Tabela 11), o que não está de acordo com a maioria da literatura consultada. Contudo, num trabalho anterior do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, também foram descritos valores negativos para estas enzimas e apenas em ratinhos expostos a CCl<sub>4</sub> (Oliveira, 2009). Neste sentido, sugere-se que a gravidade dos danos causados nos tecidos poderá ter afetado

negativamente a atividade destas enzimas. Verificou-se ainda que o ratinho nº 5 do grupo 2 apresentou um valor próximo de zero para a ALT, mas o seu valor de AST foi idêntico à média dos controlos negativos (Tabelas 10 e 11). O mesmo se verificou para os ratinhos nº 3 e 4 dos grupos 5 e 6, respetivamente. Nestes casos, estes valores não deverão ser considerados normais. Assim, partindo do pressuposto de que a severidade dos danos causados pelo CCl<sub>4</sub> poderá afetar a atividade das enzimas, estes valores corresponderão provavelmente a uma diminuição na atividade enzimática.

**Tabela 11: Cruzamento dos resultados histológicos e bioquímicos em cada ratinho dos grupos expostos ao CCl<sub>4</sub>**

	Necrose Centrolobular					AST (U/l)					ALT (U/l)				
Ratinhos	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Grupo 2	++	+++	+++	++	+++	7454	<3	<3	8402	3041	1061	9	7	4775	6
Grupo 5	+	+	++	+	+	7032	6505	3157	-	7139	156	2749	8	-	4441
Grupo 6	+	+	+	++	+	5228	7701	5370	4745	4800	4460	1316	1297	5	5398

(+) Estende-se a menos de metade da largura dos lóbulos hepáticos; (++) Afeta cerca de metade da largura dos lóbulos hepáticos; (+++); Estende-se a mais de metade da largura dos lóbulos hepáticos; (-) não se conseguiu colher sangue suficiente para análise

## IV. Conclusões e Perspetivas Futuras

O EE de *S. perennis* subsp. *perennis*, em ambas as doses, demonstrou ter alguns efeitos protetores contra os efeitos tóxicos produzidos pelo CCl<sub>4</sub>, diminuindo a quantidade de lesões histológicas no fígado e baço e o peso dos rins. Estes efeitos, poderão estar relacionados com a capacidade antioxidante dos compostos presentes. Entretanto, o EE *per se*, nas duas doses, provocou alterações histológicas em alguns órgãos, principalmente ao nível do sistema reprodutor, sugerindo que o extrato poderá conter uma fração com efeito tóxico. Alguns compostos fenólicos presentes no extrato poderão ter conferido toxicidade. A toxicidade desses compostos pode estar correlacionada não só com a dose fornecida, mas também com o efeito sinérgico de algumas moléculas (Tapas *et al*, 2008; Xia *et al*, 2010). Futuramente devem ser realizados estudos para verificar se as alterações histológicas são reversíveis e/ou testes de toxicidade, por forma a avaliar a toxicidade do extrato. A experiência também poderá ser repetida, ajustando as doses e a sua duração, por forma a perceber o impacto desses ajustes nos resultados obtidos.

Visto que o extrato foi apenas submetido a uma análise de açúcares e de compostos fenólicos, sendo estes últimos determinados por um método indireto, torna-se difícil relacionar os efeitos encontrados com a composição do mesmo. Por isso, deverá ser feita uma análise química completa do EE. Futuramente poderão ser isoladas diferentes frações e fornecê-las a ratinhos expostos e não expostos ao CCl<sub>4</sub>, de forma a conhecer /compreender qual a relação entre a composição química e os efeitos desta planta, demonstrados no presente trabalho.

Neste estudo o CCl<sub>4</sub> provocou anomalias no parênquima esplénico, não se diferenciando macrófagos, indicando um efeito nocivo ao nível do sistema imunitário, por parte deste tóxico. Contudo, são necessários estudos posteriores que o comprovem. Visto que o EE conseguiu reverter estes efeitos, futuros trabalhos serão necessários para estudar as possíveis propriedades benéficas da *S. perennis* subsp. *perennis* ao nível do sistema imunitário.

Finalmente deverão ser realizados estudos para perceber o significado dos baixos valores de AST e ALT, induzidos pelo CCl<sub>4</sub>.



## V. Referências Bibliográficas

Adedapo A.A., Omoloye O.A., Ohore O.G. (2007). *Studies on the toxicity of an aqueous extract of the leaves of Abrus precatorius in rats*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 74(1): 31–36.

Adewusi E.A., Afolayan A.J. (2010). *A review of natural products with hepatoprotective activity*. Journal of Medicinal Plants Research 4(13): 1318-1334.

Adnyana I.K., Tezuka Y., Banskota A.H., Tran K.Q., Kadota S. (2001). *Three new triterpenes from the seeds of Combretum quadrangulare and their hepatoprotective activity*. Journal of Natural Products 64(3): 360-363.

Agarwal M., Srivastava V.K., Saxena K.K., Kumar A. (2006). *Hepatoprotective activity of Beta vulgaris against CCl<sub>4</sub> - induced hepatic injury in rats*. Fitoterapia 77(2): 91-93.

Alwakeel S.S. (2008). *Microbial and heavy metals contamination of herbal medicines*. Research Journal of Microbiology 3(12): 683-691.

Aniya Y., Koyama T, Miyagi C., Miyahira M., Inomata C., Kinoshita S., Ichiba T. (2005). *Free Radical Scavenging and Hepatoprotective Actions of the Medicinal Herb, Crassocephalum crepidioides from the Okinawa Islands*. Biological and Pharmaceutical Bulletin 28(1): 19-23.

Azeem A.K., Mathew M., Dilip. C., Nair C. (2010). *Hepatoprotective effect of Averrhoa carambola fruit extract on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 3(8): 610-613.

Bafna A.R., Mishra S.H. (2006). *Immunostimulatory effect of methanol extract of Curculigoorchioides on immunosuppressed mice*. Journal of Ethnopharmacology 104 (1-2): 1-4.

Barclay L.R., Artz J.D., Mowat J.J. (1995). *Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of*



*phosphatidylcholine membranes: 14C tracer and product studies*. Biochimica et Biophysica Acta 1237(1): 77-85.

Beer A.M. (2011). *Herbal medicines used in kidney diseases in Europe*. Indian Journal of Kidney Diseases 5(2): 82-85.

Cai Y., Sun M., Corke H. (2003). *Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(8): 2288-2294.

Capua C. J., Hopson N. P., Stewart C. M. M., Johnston G. R., O'Neill K. L., Schaalje G. B., Lee C. M., Booth G. M. (2010). *Cytotoxicity of Atriplex confertifolia*. Journal of Toxicology 2010: 976548.

Castroviejo S. (1990). Sarcocornia A.J. Scott. In: Flora Iberica - Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. (Vol. II). Castroviejo S., Laínz M., López González G., Montserrat P., Muñoz Garmendia F., Paiva J., Villar L. (Eds). Real Jardín Botánico, C.S.I.C. Madrid, pp: 528-531.

Cheng C.Y., Mruk D.D. (2011). *The Blood Testis Barrier and its Implications for Male Contraception*. Pharmacology Reviews [Epub ahead of print].

Coimbra M. A., Delgadillo I., Waldron K. W., Selvendran R. R. (1996). *Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp*. Modern Methods of Plant Analysis 17: 19-44.

Cotelle N., Bernier J.L., Catteau, J.P., Pommery J., Wallet J.C., Gaydou E.M. (1996). *Antioxidant properties of hydroxyl-flavones*. Free Radical Biology and Medicine 20(1): 35-43.

Cunha A.P., Silva P.A., Roque O.R. (2006). *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 702 pp.

D'Cruz S.C, Vaithinathan S., Jubendradass R., Mathur P.P. (2010). *Effects of plant and plant products on the testis*. Asian Journal of Andrology 12: 468-479.

Daniel M. (2006). *Medicinal Plants-Chemistry and Properties*. Science Publishers, New Hampshire, 250 pp.

Davies K.J. (2000). *Oxidative stress antioxidants defenses and damage removal, repair and replacement systems*. International Union of Biochemistry and Molecular Biology 50: 279-289.

Demott R.P., Borgert C.J. (2000). *Reproductive Toxicology*. In: *Principles of Toxicology - Environmental and Industrial Applications*. P. L Williams., R. C. James, S. M. Roberts (Eds.). John Willey & Sons, INC. New York, pp: 209-238.

Deshwal N., Sharma A., Sharma P.(2011). *Review on hepatoprotective Plants*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 7(1):15-26.

Dubey S. K., Batra A. (2008). *Hepatoprotective Activity from Ethanol Fraction of Thuja occidentalis Linn*. Asian Journal of Research in Chemistry. 1(1): 32-35.

Finkel T., Holbrook N.J. (2000). *Oxidants oxidative stress and the biology of aging*. Nature 408: 239-247.

Folin O., Ciocalteu U. (1927). *On tyrosine and tryptophane determinations in proteins*. Journal of Biology Chemistry. 73(2): 627-650.

Gao J., Sun C., Yang J., Shi J., Du Y., Zhang Y., Li J., Wan H. (2011). *Evaluation of the hepatoprotective and antioxidant activities of Rubus parvifolius L*. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology) 12(2):135-142.

Gorinstein S., Yamamoto K., Katrich E., Leontowicz H., Lojek A., Leontowicz M., Cíz M., Goshev I., Shalev U., Trakhtenberg S. (2003). *Antioxidant properties of Jaffa sweets and grapefruit and their influence on lipid metabolism and plasma antioxidative potencial in rats*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 67(4):907-910.

Harbone J.B. (1989). *General procedures and measurement of total phenolics*. In: *Methods in plant biochemistry, Vol 1: Plant phenolics*. P.M Dey., J.B. Harbone (Eds), Academic Press, London. 608 pp.

Harbone J.B., Turner B.L. (1984). *Polysaccharides*. In: *Plant Chemosystematics*. Academic Press, London, pp: 461-474.

Haschek W. M., Rousseaux C. G. (1998). *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. Academic Press, London, 563 pp.

Hodgson E., Levi P. E. (2004). *Hepatotoxicity*. In: *A Textbook of Modern Toxicology*. E. Hodgson (Ed). John Wiley and Sons, INC, New Jersey, pp: 263-272.

Hodgson E., Levi P. E. (2004). *Nephrotoxicity*. In: *A Textbook of Modern Toxicology*. E. Hodgson (Ed). John Wiley and Sons, INC, New Jersey, pp: 273-278.

Huang X., Liu Y., Song F., Liu Z., Liu S. (2009). *Studies on principal components and antioxidant activity of different Radix Astragali samples using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multiple-stage tandem mass spectrometry*. Talanta 78(3):1090-1101.

Im S-A., Kim K., Lee C-K. (2006). *Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from Salicornia herbacea*. International Immunopharmacology 6(9): 1451–1458.

Jin Y.S., Sa J.H., Shim T.H., Rhee H.I., Wang M.H. (2005). *Hepatoprotective and antioxidant effects of Morus bombycis Koidzumi on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage*. Biochemical and Biophysical Research Communications 329(3):991-995.

Koh H.L., Woo S.O. (2000). *Chinese proprietary medicine in Singapore, regulatory control of toxic heavy metals and undeclared drugs*. Drug Safety 23(5):351-362.

Kondratyuk T.P., Pezzuto J.M. (2004). *Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health*. Pharmaceutical Biology 42:46-63.

Kosalec I., Cvek J., Tomic S. (2009). *Contaminants of medicinal herbs and herbal products*. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology 60:485-501.

Larson R.A. (1988). *The antioxidants of higher plants*. Phytochemistry 27(4): 969-978.

Lopes L. (2010). *Efeitos terapêuticos de Inula crithmoides em ratinhos expostos ao CCl<sub>4</sub>*. Dissertação de mestrado. Universidade de Aveiro, 77pp.

Lovkova M.Ya.,Buzuk G.N., Sokolova S.M., Kliment'va N.I. (2001).*Chemical features of medicinal plants (a review)*. Applied Biochemistry and Microbiology 37: 229-237.

Malini T., Manimaran R.R., Arunakaran J., Aruldas M.M., Govindarajulu P. (1999).*Effects of piperine on testis of albino rats*. Journal of Ethnopharmacology 64: 219–225.

Maniati E. (2007). *Assessment of phenolic compounds in biological samples*. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. 43(4):362-368.

Middendorf P.J., Williams P.L. (2000) *Nephrotoxicity: Toxic responses of the kidney*. In: *Principles of Toxicology - Environmental and Industrial Applications*. P. L. Williams, R. C. James, S. M Roberts (Eds). John Wiley & Sons, INC. New York, pp: 129-143.

Mishra R.K., Singh S.K. (2009). *Reversible antifertility effect of aqueous rhizome extract of Curcuma longa L. in male laboratory mice*. Contraception 79: 479-487.

Murugaian P., Ramamurthy V., Karmegam N. (2008). *Hepatoprotective activity of Wedelia calendulacea L. against acute hepatotoxicity in rats*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 4(6): 685-687.

Murugesan G. S, Sathishkumar M., Jayabalan R., Binupriya A.R., Swaminathan K., Yun S.E.(2009). *Hepatoprotective and Curative Properties of Kombucha Tea Against Carbon Tetrachloride-Induced Toxicity*. Journal of Microbiology and Biotechnology 19 (4): 397-402.

Nainwal P., Batsa R., Singh A., Nanda D. (2011).*Medicinal plant studies influenced by the biotechnological methods: an updated review*. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences 2 (2): 501-508.

Nishikawa S., Yamashita T., Imai T., Yoshida M., Sakuratani Y., Yamada J., Maekawa A., Hayashi M. (2010). *Thesaurus for histopathological findings in publically available reports of repeated-dose oral toxicity studies in rats for 156 chemicals*. The Journal of Toxicological Sciences 35(4): 1-8.

Oliveira S. (2009). *Efeito das cipselas de Cichorium intybus em ratinhos expostos a CCl<sub>4</sub>*. Dissertação de mestrado. Universidade de Aveiro, 75 pp.

Pal A., Banerjee B., Banerjee T., Masihm M., Pal K. (2011) *Hepatoprotective activity of Chenopodium album Linn. plant against paracetamol-induced hepatic injury in rats*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 3(3):55-57.

Pandey A., Bigonya P., Raj V., Patel K.K. (2011). *Pharmacological screening of coriandrum sativum Linn. for hepatoprotective activity*. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences 3(3): 435-441.

Pandey K.B., Rizvi S.I. (2009). *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2(5): 270-278.

Paško P., Zagrodzki P., Bartoń H., Chłopicka J., Gorinstein S. (2010). *Effect of Quinoa Seeds (Chenopodium quinoa) in Diet on some Biochemical Parameters and Essential Elements in Blood of High Fructose-Fed Rats*. Plant Foods for Human Nutrition 65:333–338.

Prasad C.S., Shukla R., Kumar A., Dubey N. K. (2009). *In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of Cymbopogon martini and Chenopodium ambrosioides and their synergism against dermatophytes*. Mycoses 53: 123–129.

Rasool M.K., Sabina E.P., Ramya S.R., Preety P., Patel S., Mandal N., Mishra P.P., Samuel J.(2010). *Hepatoprotective and antioxidant effects of gallic acid in paracetamol-induced liver damage in mice*. Journal of Pharmacy and Pharmacology 62(5):638-643.

Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. (1999). *The Molecular Composition of Plant Cells. In: Biology of Plants*. W. H. Freeman and Company, New York, pp: 17-37.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine 26(9-10): 1231-1237.

Renard C.M.G.C., Champenois, Y., Thibault, J.F. (1993). *Characterization of the extractable pectins and hemicelluloses of the cell-wall of glasswort, Salicornia ramosissima*. Carbohydrate Polymers 22: 239–245.

Rhee M.H., Park H., Cho J.Y. (2009). *Salicornia herbacea: Botanical, chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant*. Journal of Medicinal Plants Research 3(8): 548-555.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1999). *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radical Biology and Medicine 20(7): 933-956.

Roberts S.M., Adams L. (2000). *Immunotoxicity: Toxic Effects on the Immune System*. In: *Principles of Toxicology - Environmental and Industrial Applications*. P. L. Williams, R. C. James, S. M. Roberts (Eds.). John Wiley & Sons, INC, New York, pp: 189-206.

Roberts S.M., James R.C., Franklin M.R. (2000). *Hepatotoxicity: Toxic Effects on the Liver*. In: *Principles of Toxicology - Environmental and Industrial Applications*. P. L., Williams, R. C. James, S. M. Roberts (Eds.). John Wiley & Sons, INC. New York, pp: 111-128.

Rodrigues S., Silva H., Pereira M.L. (2011). *Avaliação terapêutica de Inula crithmoides L. em órgãos reprodutores de ratinhos expostos a tetracloreto de carbono*. CAPTAR 3(1): 15-29.

Rubin E. (2006). *Patologia - Bases Clinicopatológicas da Medicina*. Guanabara-Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1625 pp.

Selgrade, M. K. (2004). *Immunotoxicity*. In: *A Textbook of Modern Toxicology*. E. Hodgson (Ed). John Wiley and Sons, INC. New Jersey, pp: 327-342.

Selvendran R. R., March J. F., Ring S. G. (1979). *Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber*. Analytical Biochemistry, 96(2): 282-292.

Shahjahan M, Sabitha K.E, Jainu M, Devi S. (2004). *Effect of Solanum trilobatum against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats*. Indian Journal of Medical Research 120: 194-198.

Silva V. (2009). *Ação de extractos de pterospartum tridentatum em ratinhos expostos a CCl<sub>4</sub>*. Dissertação de mestrado. Universidade de Aveiro. 84 pp.

Sisodia R., Yadav R.K., Sharma K.V., Bhatia A.L. (2008). *Spinacia oleracea Modulates Radiation-Induced Biochemical Changes in Mice Testis*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 70(3): 320–326.

Son S., Lewis B.A. (2002). Free Radical Scavenging and antioxidant activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure activity relationship. Journal of Agricultural and Food chemistry 50(3): 468-472.

Spinella M. (2002). *The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines*. Alternative Medicine Review 7(2): 130-137.

Sun J., Chu Y.F., Wu X., Liu R.H. (2002). *Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(25): 7449-7454.

Tapas A.R., Sakarkar D.M., Kakde R.B. (2008). *Flavonoids as Nutraceuticals: A review*. Tropical Journal of Pharmaceuthical Research 7(3): 1089-1099.

Ulicná O., Greksák M., Vancová O., Zlato L., Galbavý S. Bozek P., Nakano M. (2003). *Hepatoprotective Effect of Rooibos Tea (Aspalathus linearis) on CCl<sub>4</sub> - Induced Liver Damage in Rats*. Physiological Research 52: 461-466.

Velioglu, Y.S., Mazza G., Gao L. Oomch B.D. (1998). *Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46(10): 4113-4117.

Ventura Y., Wuddineha W.A., Myrzabayevab M., Alikulovb Z., Khozin-Goldberga I., Shpigelc M., Samochad T.M., Sagia M. (2011) *Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual Salicornia and perennial Sarcocornia halophytes as leafy vegetable crops*. Scientia Horticulturæ 128: 189–196.

- Wabo P. J., Yondo J., Fossi T. O., Marie C. K., Bilong B. C. F., Mpoame M. (2011). *The in vitro effects of Chenopodium ambrosioides (Chenopodiaceae) extracts on the parasitic nematode Heligmosomoides bakeri (Nematoda, Heligmosomatidae)*. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy 3(4): 56-62.
- Wolf P.L. (1999). *Biochemical diagnosis of liver disease*. Indian Journal of Clinical Biochemistry 14(1): 59-90.
- Xia E., Deng G., Guo Y., Li H. (2010). *Biological Activities of Polyphenols from Grapes*. International Journal of Molecular Sciences 11: 622-646.
- Xie H. (2011) *Toxicity of Chinese Veterinary Herbal Medicines*. American Journal of Traditional Chinese Medicine 6(2): 45-53.
- Yong E.L., Loh Y.S. (2004) Herbal Medicine: *Criteria for use in health and disease*. In: *Herbal and Traditional Medicine*. L. Packer, C.N. Ong, B. Halliwell (Eds.) Marcel Dekker INC, New York, pp: 73-84.
- Zheng W., Wang S.Y. (2001). *Antioxidante activity and phenolic compounds in selected herbs*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(11): 5165-5170.



# ANEXO 1

## Protocolo do processamento histológico e coloração de Hematoxilina-Eosina

Processamento Histológico*	
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Fixador (solução de Bouin ou formaldeído 4% tamponado) - 24 horas</li><li>2. Etanol 70° - 24 horas</li><li>3. Etanol 90°-1 hora</li><li>4. Etanol 100°- 1 hora</li><li>5. Etanol 100° - 30 minutos</li><li>6. Etanol a 100°: Benzol (1:1) – 30 minutos</li><li>7. Benzol – 1 hora e 30 minutos</li><li>8. Benzol e aparas de parafina (p.f. 42°C-44°C) – 30 minutos á temperatura ambiente</li><li>9. Benzol e aparas de parafina (p.f. 42°C-44°C) - 1 hora na estufa a 40°C</li><li>10. Parafina (p.f. 42°C-44°C) – 1 hora na estufa a 60°C</li><li>11. Parafina (p.f. 56°-58°C) - 30 minutos na estufa a 60°C</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>12. Xilol – 10 minutos</li><li>13. Etanol a 100° - 5 minutos</li><li>14. Etanol a 95° - 5 minutos</li><li>15. Etanol a 75° - 5 minutos</li><li>16. Etanol a 50° - 5 minutos</li><li>17. Água corrente - 15 minutos</li><li>18. Hematoxilina de Mayer - 15 minutos</li><li>19. Água corrente - 15 minutos</li><li>20. Eosina- 2 minutos</li><li>21. Etanol a 100° - 30 segundos</li><li>22. Etanol a 95° - Passagem por duas tinas</li><li>23. Xilol - Passagem por duas tinas</li><li>24. Montagem em meio Eukitt® (Vidrolab)</li></ol>

\*Protocolo otimizado no laboratório de Histologia Animal da Universidade de Aveiro.